



**HAL**  
open science

**Caractérisation de nouvelles fonctions biologiques et  
modifications post-traductionnelles du facteur d'épissage  
SC35 dans des modèles cellulaires de carcinomes  
pulmonaires**

Valérie Edmond

► **To cite this version:**

Valérie Edmond. Caractérisation de nouvelles fonctions biologiques et modifications post-traductionnelles du facteur d'épissage SC35 dans des modèles cellulaires de carcinomes pulmonaires. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT: . tel-00531801

**HAL Id: tel-00531801**

**<https://theses.hal.science/tel-00531801>**

Submitted on 3 Nov 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université de Grenoble  
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

## THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**  
Spécialité : **Biologie du Développement – Oncogénèse**

Soutenue publiquement par

**Valérie EDMOND**

Le 7 Septembre 2010

---

---

# **Caractérisation de nouvelles fonctions biologiques et modifications post-traductionnelles du facteur d'épissage SC35 dans des modèles cellulaires de carcinomes pulmonaires**

---

---

**Thèse dirigée par Béatrice EYMIN**

**Membres du jury :**

Rapporteur : **Dr Didier AUBOEUF**, Lyon  
Rapporteur : **Dr Olivier COUX**, Montpellier  
Examineur : **Pr Elisabeth BRAMBILLA**, Grenoble  
Examineur : **Dr Saadi KHOCHBIN**, Grenoble  
Examineur : **Pr Jamal TAZI**, Montpellier  
Examineur : **Dr Béatrice EYMIN**, Grenoble

Équipe 2 : Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon  
Centre de Recherche INSERM/UJF U823  
Institut Albert Bonniot – Grenoble

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé à l'Institut Albert Bonniot, au sein de l'équipe Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon. Il a été intégralement financé par l'association **AGIR à dom**.

Je remercie le **Professeur Christian BRAMBILLA** pour m'avoir accueillie dans son Centre de Recherche INSERM/UJF. Ses appuis m'ont toujours permis de bénéficier d'excellentes conditions scientifiques et matérielles qui m'ont pleinement aidée à la conduite de ce travail.

Je remercie le **Professeur Elisabeth BRAMBILLA** pour m'avoir offert l'opportunité de travailler dans son équipe de recherche.

Je remercie également les membres du jury, le **Docteur Didier AUBOEUF** et le **Docteur Olivier COUX** qui m'ont fait l'honneur d'évaluer et de critiquer ce travail en tant que rapporteurs, ainsi que le **Professeur Jamal TAZI** et le **Docteur Saadi KHOCHBIN** pour leur participation en tant qu'examineurs à ce jury de thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au **Docteur Béatrice EYMIN** pour m'avoir accueillie au sein de son groupe de recherche il y a plus de cinq ans lors de mon stage de première année de Master et pour m'avoir donné l'opportunité d'y effectuer également mon doctorat. Merci pour sa confiance, ses conseils toujours avisés, son attention constante et sa rigueur scientifique. Sa patience sans limites pour répondre à mes questions, son esprit critique ainsi que la pleine liberté qu'elle m'a offerte, m'ont fourni la meilleure des formations.

Je remercie le **Docteur Sylvie GAZZERI** pour ses critiques scientifiques toujours constructives, sa vivacité d'esprit et sa bonne humeur au quotidien.

Un grand merci, également, à **Patricia, Céline, Pascal, Laura et Floriane**. Votre aide technique, votre disponibilité et votre gentillesse m'ont toujours été très précieuses.

Merci à tous mes collègues du bureau 106, **Arnaud, Peggy, Galia, Elodie**, et plus récemment **Delphine**, pour avoir contribué à cette excellente ambiance de travail ponctuée de moments plus décontractés.

Je remercie également **tous les membres de l'équipe 2 et de l'équipe 5**, ainsi que tous ceux qui ont participé de loin ou de près à ces travaux.

Un grand merci à **Damien** et au "**club des statisticos**" pour ces bons moments de détente mais aussi de compétition passés ensemble. Les rendez-vous pétanque du jeudi auront été mémorables. Vous allez me manquer.

Merci à tous mes amis et mes proches de Grenoble et d'ailleurs, pour avoir su me changer les idées et me faire décompresser quand j'en avais le plus besoin, et tout particulièrement **Jonathan, Maliesse, Estelle, Simon et Quentin**.

Enfin, j'exprime ma plus grande reconnaissance à **mes parents**, pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ce parcours, notamment dans les moments de doute. Sans eux, je n'en serais pas là aujourd'hui. Je vous aime infiniment. Un grand merci également à ma sœur **Céline** ainsi qu'à **mes grands-parents**, pour avoir été, malgré la distance qui nous sépare, toujours présents pour moi. Merci du fond du cœur.



<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>1</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>3</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>7</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>10</b>

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
---------------------------	-----------

<b>I. Le facteur de transcription E2F1 : présentation, mécanismes de régulation et fonctions biologiques</b> .....	<b>14</b>
--	-----------

<b>I.1. Organisation de la famille E2F</b> .....	<b>14</b>
--	-----------

I.1.1 La voie de signalisation E2F/RB : une voie conservée au cours de l'évolution -	14
--	----

I.1.2 Les membres de la famille E2F chez l'Homme .....	15
--	----

I.1.3 Les différents sous-groupes de la famille E2F.....	16
--	----

<b>I.2. Activités biologiques de E2F1 et régulation de ses fonctions</b> .....	<b>18</b>
--	-----------

I.2.1 E2F1 et contrôle du cycle cellulaire.....	19
---	----

I.2.1.1 Vue traditionnelle de la fonction de E2F1 : contrôle du passage en phase S	19
--	----

I.2.1.2 Mécanismes moléculaires du contrôle de l'activité de E2F1 au cours du cycle cellulaire .....	20
--	----

I.2.2 E2F1 : un régulateur des processus apoptotiques .....	24
---	----

I.2.3 Implication de E2F1 dans les processus de réparation des cassures de l'ADN---	26
---	----

I.2.4 Contrôle des processus angiogéniques par E2F1.....	28
--	----

<b>I.3. Rôle ambigu de E2F1 au cours de la tumorigénèse</b> .....	<b>28</b>
---	-----------

I.3.1 Propriétés oncogéniques de E2F1 .....	28
---	----

I.3.2 Propriétés suppressives de tumeur de E2F1 .....	29
---	----

I.3.3 Altération de l'expression de E2F1 dans les tumeurs humaines .....	30
--	----

<b>II. Epissage des pré-ARNm et protéines SR</b> .....	<b>31</b>
--	-----------

<b>II.1. Généralités sur l'épissage</b> .....	<b>31</b>
---	-----------

II.1.1 Définition de l'épissage.....	31
--------------------------------------	----

II.1.2 Mécanismes moléculaires de l'épissage.....	32
---	----

II.1.2.1 Séquences nécessaires à l'identification et l'élimination d'introns.....	32
---	----

II.1.2.2 Processus réactionnel de l'épissage .....	33
--	----

II.1.2.3 Assemblage des complexes splicéosomiaux et facteurs protéiques participant à cet assemblage -----	34
II.1.2.4 Les différents modes d'épissage alternatif -----	35
II.1.3 Régulation de l'épissage alternatif -----	37
II.1.3.1 Des sites d'épissage sous-optimaux et des éléments de séquences régulatrices agissant en "cis"-----	38
II.1.3.2 Facteurs protéiques impliqués dans l'épissage et agissant en "trans" -----	39
II.1.4 Couplage entre transcription et épissage -----	40
<b>II.2. Les protéines SR-----</b>	<b>46</b>
II.2.1 Présentation de la famille des protéines SR-----	46
II.2.2 Principales caractéristiques structurales des protéines SR -----	48
II.2.2.1 Le domaine RRM de fixation à l'ARN des protéines SR -----	48
II.2.2.2 Le domaine RS des protéines SR -----	49
II.2.3 Mécanismes d'action des protéines SR-----	50
II.2.3.1 Rôle des protéines SR dans l'épissage constitutif et alternatif -----	50
II.2.3.2 Rôle des protéines SR dans les mécanismes cellulaires post-épissage -----	54
II.2.4 Régulation de l'activité des protéines SR -----	56
II.2.4.1 Rôle de la phosphorylation des protéines SR dans la réaction d'épissage--	57
II.2.4.2 Rôle de la phosphorylation dans la localisation sub-nucléaire des protéines SR-----	57
II.2.4.3 Rôle de la phosphorylation des protéines SR dans la navette noyau-cytoplasme-----	59
II.2.4.4 Kinases et phosphatases impliquées dans le contrôle de la phosphorylation réversible des protéines SR -----	61
II.2.4.5 Autres modifications post-traductionnelles des protéines SR -----	63
II.2.4.6 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des protéines SR--	64
II.2.5 Fonctions biologiques des protéines SR-----	64
II.2.5.1 Rôle des protéines SR dans la viabilité cellulaire et le développement ----	65
II.2.5.2 Rôle des protéines SR au cours du cycle cellulaire -----	65
II.2.5.3 Rôle des protéines SR dans l'apoptose et la réponse aux dommages de l'ADN -----	67
II.2.5.4 Rôle des protéines SR dans le maintien de la stabilité génomique -----	68
<b>II.3. Epissage et cancer-----</b>	<b>69</b>
II.3.1 Anomalies en "cis" -----	70
II.3.2 Anomalies affectant les protéines régulant l'épissage-----	71
<b>III. L'acétylation des protéines non-histones -----</b>	<b>75</b>
<b>III.1. Aspects généraux de l'acétylation -----</b>	<b>75</b>

III.1.1 Définition -----	75
III.1.2 Acteurs moléculaires de l'acétylation/déacétylation-----	76
III.1.2.1 Les histones acétyltransférases (HATs) -----	76
III.1.2.2 Les différentes classes d'histones déacétylases-----	77
<b>III.2. Exemples d'enzymes à activité acétyltransférase et à activité déacétylase -----</b>	<b>78</b>
III.2.1 L'acétyltransférase Tip60 : une protéine clé de la réponse aux dommages de l'ADN-----	78
III.2.1.1 Structure et caractéristiques générales de Tip60 -----	78
III.2.1.2 Fonctions biologiques de Tip60 -----	79
III.2.2 HDAC6 : une déacétylase cytoplasmique singulière -----	81
III.2.2.1 Description générale de HDAC6 -----	81
III.2.2.2 Les substrats de HDAC6-----	82
III.2.2.3 Fonctions cellulaires de HDAC6 -----	83
<b>III.3. Conséquences fonctionnelles de l'acétylation des protéines non-histones -----</b>	<b>84</b>
<b>III.4. Les inhibiteurs des histones déacétylases (HDACi)-----</b>	<b>87</b>
III.4.1 Classification des inhibiteurs de HDACs -----	88
III.4.2 Mécanisme d'action et effets biologiques des HDACi-----	88
<b>III.5. Acétylation et cancer -----</b>	<b>90</b>
III.5.1 Activité HDAC et/ou HAT aberrante associée au cancer-----	90
III.5.2 Les inhibiteurs de HDACs en thérapie anticancéreuse-----	92
 <b>OBJECTIFS DE TRAVAIL DE THESE-----</b>	 <b>94</b>
 <b>RESULTATS-----</b>	 <b>97</b>
 <b>I. Article 1-----</b>	 <b>97</b>
<b>II. Article 2-----</b>	<b>133</b>
<b>III. Article 3 -----</b>	<b>164</b>
<b>IV. Article 4-----</b>	<b>174</b>
 <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES -----</b>	 <b>206</b>
 <b>I. Mise en évidence d'une connexion étroite entre l'acétylation et la phosphorylation de SC35 pour le contrôle de son « turn-over » protéique et de ses activités biologiques-----</b>	 <b>206</b>

<b>I.1. Identification d'une nouvelle modification post-traductionnelle de SC35 de type acétylation</b> .....	206
<b>I.2. Implication de l'acétyltransférase Tip60 dans le contrôle du « turn-over » protéique de SC35</b> .....	207
<b>I.3. La déacétylase HDAC6 : un régulateur clé de la stabilité protéique de SC35</b> -	208
<b>I.4. Relation inverse entre le degré de phosphorylation et le niveau d'acétylation de SC35</b> .....	210
<b>I.5. La voie de signalisation Tip60/HDAC6/SC35 = un rôle différent selon le signal « d'activation » via le contrôle des modifications post-traductionnelles de SC35</b> --	211
I.5.1 SC35 hyperphosphorylée et hypoacétylée : une protéine apoptotique en réponse aux stress génotoxiques .....	211
I.5.2 SC35 hyperacétylée et hypophosphorylée : une protéine médiant la sénescence en réponse aux HDACi .....	213
<b>I.6. Vers un effet synergique possible de SC35 dans la réponse des cellules tumorales aux traitements conventionnels (chimiothérapies) et non conventionnels (HDACi)</b>	215
<b>II. SC35 et E2F1 : deux partenaires pour le contrôle de grandes fonctions biologiques</b> .....	216
<b>II.1. SC35 : une nouvelle cible transcriptionnelle directe de E2F1</b> .....	216
<b>II.2. SC35 et E2F1 coopèrent pour induire l'apoptose en réponse aux agents génotoxiques</b> .....	217
<b>II.3. SC35 contrôle les fonctions prolifératives de E2F1</b> .....	218
<b>II.4. Un modèle hypothétique de coopération entre E2F1 et SC35 pour le contrôle de fonctions biologiques essentielles</b> .....	220
<b>III. Implication des fonctions identifiées de SC35 au cours du processus de carcinogénèse bronchique</b> .....	222
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	225
<b>ANNEXE</b> .....	263

<b>FIGURE 1 : CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE E2F</b> -----	16
<b>FIGURE 2 : ORGANISATION DU RESEAU E2F/RB CHEZ LES MAMMIFERES</b> -----	17
<b>FIGURE 3 : DEUX MECANISMES DE REPRESSION DE LA TRANSCRIPTION DEPENDANTE DE E2F PAR FIXATION DE RB AUX COMPLEXES E2F-DP AU COURS DE LA PHASE G0/G1 DU CYCLE CELLULAIRE</b> -----	21
<b>FIGURE 4 : REGULATION DE L'ACTIVITE DE E2F1 AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE</b> -----	22
<b>FIGURE 5 : ROLE DE E2F1 DANS LA REPOSE AUX DOMMAGES DE L'ADN</b> -----	27
<b>FIGURE 6 : L'EPISSAGE, UN PROCESSUS EN DEUX ETAPES QUI REQUIERT DES SEQUENCES SPECIFIQUES</b> -----	33
<b>FIGURE 7 : REPRESENTATION DES DIFFERENTS MODES D'EPISSAGE ALTERNATIF ET CONSTITUTIF</b> -----	37
<b>FIGURE 8 : REGULATION DE L'EPISSAGE ALTERNATIF PAR DES SEQUENCES REGULATRICES</b> -----	38
<b>FIGURE 9 : TRANSCRIPTION ET EPISSAGE, DEUX EVENEMENTS COUPLES POUR UN MEILLEUR CONTROLE DE L'EXPRESSION GENIQUE</b> -----	42
<b>FIGURE 10 : REGULATION DE L'EPISSAGE DU PRE-ARN<sub>m</sub> PAR LA STRUCTURE CHROMATINIENNE ET PAR LES ENZYMES DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE</b> -----	44
<b>FIGURE 11 : MODELE DU RECRUTEMENT DES FACTEURS D'EPISSAGE PAR LES MODIFICATIONS EPIGENETIQUES DES HISTONES DURANT LA TRANSCRIPTION</b> -----	45
<b>FIGURE 12 : ORGANISATION STRUCTURALE DE LA FAMILLE DES PROTEINES SR HUMAINES</b> -----	47

<b>FIGURE 13 : ACTIVATION DE L'ÉPISSAGE PAR LES PROTÉINES SR DE MANIÈRE EXON-DEPENDANTE OU EXON-INDEPENDANTE</b> -----	52
<b>FIGURE 14 : LES PROTÉINES SR SONT LES ACTEURS MAJEURS D'UN RÉSEAU DE VOIES DE SIGNALISATION CONDUISANT À LA RÉGULATION DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF</b> -----	56
<b>FIGURE 15 : DEUX VOIES DISTINCTES DE RECYCLAGE DES PROTÉINES SR AU COURS DE L'ÉPISSAGE ET LA MATURATION DE L'ARNm</b> -----	60
<b>FIGURE 16 : CAUSES ET POSSIBLES CONSÉQUENCES FONCTIONNELLES DES ANOMALIES AFFECTANT L'ÉPISSAGE DES PRE-ARNm</b> -----	74
<b>FIGURE 17 : REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFÉRENTS DOMAINES DE L'HISTONE ACÉTYLTRANSFERASE TIP60</b> -----	79
<b>FIGURE 18 : FONCTIONS BIOLOGIQUES DE L'ACÉTYLTRANSFERASE TIP60</b> ----	80
<b>FIGURE 19 : ORGANISATION STRUCTURALE DE LA DEACÉTYLASE HDAC6 HUMAINE</b> -----	82
<b>FIGURE 20 : PRINCIPAUX MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA STABILITÉ PROTÉIQUE METTANT EN JEU L'ACÉTYLATION DES LYSINES</b> -----	86
<b>FIGURE 21 : HYPOTHÈSE DE TRAVAIL BASÉE SUR LE COUPLAGE TRANSCRIPTION/ÉPISSAGE</b> -----	220
<b>FIGURE 22 : RÔLE MULTIFONCTIONNEL DE LA PROTÉINE SC35 : IMPORTANCE DU STATUT DE SES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES</b> -----	221
<b>TABLE 1 : RÔLES DES PROTÉINES SR DANS LES PROCESSUS DE RÉGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE L'EXPRESSION DES GÈNES</b> -----	55
<b>TABLE 2 : EXEMPLES DE MUTATIONS DANS DES SÉQUENCES D'ÉPISSAGE AGISSANT EN "CIS" ASSOCIÉES À DES PATHOLOGIES MALIGNES</b> -----	70

<b>TABLE 3 : FACTEURS D'EPISSAGE ALTERES DANS LES CANCERS ET CIBLES POTENTIELLES-----</b>	<b>73</b>
<b>TABLE 4 : EXEMPLES DE PROTEINES NON-HISTONES SUBSTRATS D'ACETYLATION-----</b>	<b>76</b>
<b>TABLE 5 : CONSEQUENCES FONCTIONNELLES DE L'ACETYLATION DE PROTEINES NON-HISTONES-----</b>	<b>85</b>
<b>TABLE 6 : DIFFERENTS INHIBITEURS DE HDACS ACTUELLEMENT UTILISES EN PHASE CLINIQUE-----</b>	<b>93</b>

APAF-1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1  
AR : Androgen Receptor  
ARNi : ARN interférence  
ATM/ATR : Ataxia Telangiectasia Mutated/Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related  
BAF53 : 53 kDa BRG-1/human BRM Associated Factor  
BRCA1 : BReast CAncer 1  
CaMKIIdelta : Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase IIdelta  
CBP : CREB Binding Protein  
CDC : Cell Division Cycle  
CDK : Cycline Dependent Kinase  
CHK : Checkpoint Kinase  
CTE : Constitutive Transport Element  
CLK : CDC2-Like Kinase  
DDR : DNA Damage Response  
DHFR : Dihydrofolate Réductase  
DISC : Death Inducing Signaling Complex  
DNAPKcs : DNA dependent Protein Kinase catalytic subunit  
E2F1 : E2F factor 1  
ESE : Exonic Splicing Enhancer  
ESS : Exonic Splicing Silencer  
FHIT : Fragile Histidine Triad  
GNAT : GCN5 related N-AcetylTransferase  
GSK3 : Glycogène Synthase Kinase 3  
HAT: Histone Acétyltransférase  
HDAC : Histone Déacétylase  
HIF-1 $\alpha$  : Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$   
HIV-1 : Human Immunodeficiency Virus-1  
hnRNP : Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein  
HSF1 : Heat Shock Factor 1  
HSP : Heat Shock Protein  
IHC : ImmunoHistoChimie  
ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated DNase  
IRES : Internal Ribosome Entry Site  
ISE : Intronic Splicing Enhancer



ISS : Intronic Splicing Silencer  
LCoR : Ligand-dependent CoRepressor  
MCM : MiniChromosome Maintenance  
MDM2 : Murine Double Minute 2  
MEF : Murine Embryonic Fibroblasts  
MNK2 : MAPK (mitogen-activated protein kinase)-interacting kinase 2  
MORF : MOnocytic leukemia zinc finger Related Factor  
MOZ : MOnocytic leukaemia Zinc finger protein  
MRN : Mre11/Rad50/Nbs1  
mTOR : mammalian Target of Rapamycin  
MYC : MYeloCytomatosis oncogene  
MYST : MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et Tip60  
NES : Nuclear Export Signal  
NF $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells  
NLS : Nuclear Localization Signal  
NMD : Non-sense Mediated Decay  
ORC1 : Origin Recognition Complexe subunit 1  
P/CAF : p300/CBP Associated Factor  
p107 : pocket protein p107  
p300/CBP : p300/CREB Binding Protein  
PcG : Polycomb Group  
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen  
PKC : Protein Kinase C  
PKCI-1 : Protein Kinase C-Interacting protein 1  
PTB : Polypyrimidine Tract Binding protein  
PUMA : p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis  
RB : Rétinoblastome  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
RRM : RNA Recognition Motif  
Runx3 : Runt related transcription factor 3  
SE14 : Serine-glutamate containing tetradecapeptide  
SELEX : Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment  
SR : Serine/arginine-rich proteins  
TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor- $\beta$

Tip60 : Tat Interacting Protein 60 kDa

TK : Thymidine Kinase

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRRAP : TRansformation/tRanscription domain Associated Protein

TS : Thymidylate Synthase

UBF : Upstream Binding transcription Factor

UICC : Union Internationale Contre le Cancer

VEGF-A : Vascular Endothelial Growth Factor-A

VHL : Von Hippel-Lindau

yHDA1 : yeast Histone Deacetylase A1

yRPD3 : yeast Reduced Potassium Dependency 3

ySIR2 : yeast Silent Information Regulator 2

ZnF-UBP : Zinc Finger Ubiquitin Binding domain

## AVANT-PROPOS

Un des principaux objectifs du laboratoire est l'identification de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la progression des cancers pulmonaires, afin d'améliorer la détection précoce de ces cancers et d'établir des thérapeutiques ciblées plus efficaces et moins agressives. Depuis plusieurs années, notre équipe s'intéresse tout particulièrement à l'inactivation des voies de signalisation de deux gènes suppresseurs de tumeurs, les gènes *p53* et *Rb*, et aux protéines situées à l'interface de ces deux voies, notamment le facteur de transcription E2F1. Sur la base de nos travaux démontrant un profil d'expression différentiel de E2F1 dans les tumeurs bronchiques, nous avons émis l'hypothèse de fonctions ambivalentes de E2F1 dans ces cancers. Mon travail de thèse s'est inscrit dans ce contexte visant à caractériser de nouvelles fonctions biologiques de E2F1 dans des modèles de lignées cellulaires découlant de carcinomes bronchiques.

A mon arrivée au laboratoire, j'ai participé à une étude identifiant le facteur d'épissage SC35 comme une cible transcriptionnelle directe de E2F1 au cours du processus apoptotique. Mon travail a ensuite consisté à rechercher si SC35 contribuait aussi aux fonctions prolifératives de E2F1, et à investiguer de nouvelles modifications post-traductionnelles de SC35 susceptibles de contrôler son expression et/ou son activité, notamment l'acétylation.

C'est pourquoi j'ai choisi de scinder mon introduction en trois grands chapitres :

- Un premier chapitre présentant les grandes fonctions biologiques et les mécanismes de régulation du facteur de transcription E2F1, le partenaire de SC35 que nous avons identifié.
- Un second chapitre décrivant brièvement les principaux mécanismes de l'épissage et replaçant le facteur d'épissage SC35 au sein de la famille des protéines SR qui joue un rôle déterminant au cours de ce processus.
- Un troisième chapitre exposant les grandes généralités sur l'acétylation des protéines non-histones et les mécanismes d'action des inhibiteurs de HDACs.

# **I. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION E2F1 : PRESENTATION, MECANISMES DE REGULATION ET FONCTIONS BIOLOGIQUES**

Depuis sa découverte, il y a une vingtaine d'années, la famille des facteurs de transcription E2F n'a cessé de fasciner et en même temps de déconcerter la communauté scientifique internationale. En effet, les protéines E2F ont longtemps été perçues comme des régulateurs positifs cruciaux de la transition des cellules en phase S du cycle cellulaire. Des études plus récentes ont néanmoins montré qu'en fonction du contexte, elles jouaient des rôles plus contrastés dans l'activation et la répression de la transcription, et étaient impliquées dans divers processus biologiques telles que la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose ou encore la réparation de l'ADN.

## **I.1. Organisation de la famille E2F**

### **I.1.1 La voie de signalisation E2F/RB : une voie conservée au cours de l'évolution**








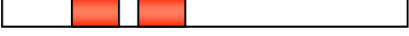
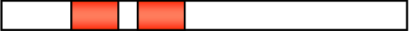
Les facteurs de transcription de la famille E2F sont les effecteurs directs de la voie de signalisation de la protéine du rétinoblastome (RB), qui est le produit du gène muté dans les rétinoblastomes héréditaires et sporadiques (Chellappan *et al*, 1991). Des homologues des protéines E2F et RB ont été décrits chez la drosophile (Dynlacht *et al*, 1994; Ohtani & Nevins, 1994), le ver (Ceol & Horvitz, 2001), la grenouille (Suzuki & Hemmati-Brivanlou, 2000) et chez plusieurs espèces de plantes (Ramirez-Parra *et al*, 1999; Rossignol *et al*, 2002). L'importance de la voie E2F/RB est soulignée par sa conservation au cours de l'évolution bien que celle-ci soit beaucoup plus simple chez la drosophile et chez le ver que chez les mammifères. Ainsi, la drosophile ne possède que deux gènes E2F (dE2F1 et dE2F2), un gène DP (dDP) et deux gènes homologues RB (RBF1 et RBF2). Cette simplicité d'organisation et de fonctionnement génétiques a grandement aidé à l'analyse des fonctions biologiques exercées par les facteurs E2F et a également fourni des indications précieuses sur leurs mécanismes d'action.

### I.1.2 Les membres de la famille E2F chez l'Homme

La protéine E2F1, le premier membre de la famille des facteurs de transcription E2F, a été découverte en 1986 et isolée par trois groupes indépendants de part sa capacité à fixer et activer le promoteur du gène adénoviral E2 (Kovesdi *et al*, 1986; La Thangue & Rigby, 1987; Yee *et al*, 1987). Le gène *e2f1* est localisé sur le bras long du chromosome 20 (20q11.2) et contient 7 exons. Il code pour une protéine nucléaire de 437 acides aminés dont le poids moléculaire est de 60 kDa (Neuman *et al*, 1996). La protéine E2F1 interagit directement avec RB (Helin *et al*, 1992; Kaelin *et al*, 1992; Weinberg, 1995). D'autres membres de la famille ont par la suite été identifiés par homologie de séquence et par leur capacité de liaison aux protéines de la famille RB.

A ce jour, la famille des facteurs E2F comprend 8 membres (E2F1-E2F8) chez l'homme (**Figure 1**). De plus, deux protéines E2F3 (E2F3a et E2F3b) sont générées à partir du gène *e2f3* à travers l'utilisation de promoteurs alternatifs (He *et al*, 2000a; Leone *et al*, 2000). Plus récemment, il a été mis en évidence que le locus des gènes *e2f6* et *e2f7* produit plusieurs ARNm alternativement épissés qui codent pour des isoformes protéiques distinctes dont les activités biologiques n'ont pas encore été élucidées (Di Stefano *et al*, 2003; Kherrouche *et al*, 2004). Le plus haut degré d'homologie existant entre les membres de la famille E2F se situe dans le domaine de liaison à l'ADN. Les six premiers membres de la famille sont les mieux décrits et étudiés aujourd'hui. Ils nécessitent une dimérisation avec l'une des trois protéines DP (DP1, DP2/3 ou DP4) pour former un complexe transcriptionnellement actif et lier l'ADN avec une forte affinité (pour revue, DeGregori & Johnson, 2006). La fonction de l'hétérodimère E2F-DP est essentiellement déterminée par la sous-unité E2F. A l'exception de E2F6, ils présentent tous des caractéristiques structurales similaires, à savoir un domaine de liaison à l'ADN dans leur région N-terminale, un domaine de dimérisation avec l'une des protéines DP, et un domaine de transactivation qui englobe, dans son extrémité C-terminale, un domaine d'interaction avec l'une des protéines de la famille RB, aussi appelées « protéines pocket », qui incluent RB, p107 et p130. Les protéines E2F1, E2F2 et E2F3 contiennent en plus un site d'interaction avec le complexe cycline A-cdk2 situé dans leur extrémité N-terminale (Krek *et al*, 1994) ainsi qu'un signal de localisation nucléaire (NLS) (Muller *et al*, 1997). De façon intéressante, malgré la présence de l'élément NLS, E2F1 peut être retrouvé dans le cytoplasme (Jordan-Scuitto *et al*, 2000; Bi *et al*, 2001; Eymin *et al*, 2001). L'absence de NLS dans les protéines E2F4 et E2F5 est compensée par l'existence d'un autre domaine nommé NES (Nuclear Export Signal). Ce

domaine assure l'hétérodimérisation des deux protéines avec les protéines DP et leur translocation noyau-cytoplasme qui est régulée au cours du cycle (Verona *et al*, 1997; Tsantoulis & Gorgoulis, 2005). Les protéines E2F7 et E2F8 sont les derniers membres décrits de la famille E2F. Elles sont caractérisées par la présence de deux domaines de liaison à l'ADN et se fixent à l'ADN indépendamment de DP, sans doute comme un homodimère (de Bruin *et al*, 2003; Logan *et al*, 2005).

		Liaison DP	Liaison famille RB	Répression	Activation
E2F1		+	RB	-	++
E2F2		+	RB	-	++
E2F3a		+	RB	-	++
E2F3b		+	RB	+/-	+/-
E2F4		+	RB, p107, p130	++	+/-
E2F5		+	p107, p130	++	+/-
E2F6		-	-	++	-
E2F7		-	-	++	-
E2F8		-	-	++	-

■ = NLS   
■ = Liaison à l'ADN   
■ = Dimérisation   
■ = Transactivation   
■ = Liaison famille RB

**Figure 1 : Caractéristiques structurales des facteurs de transcription de la famille E2F.**

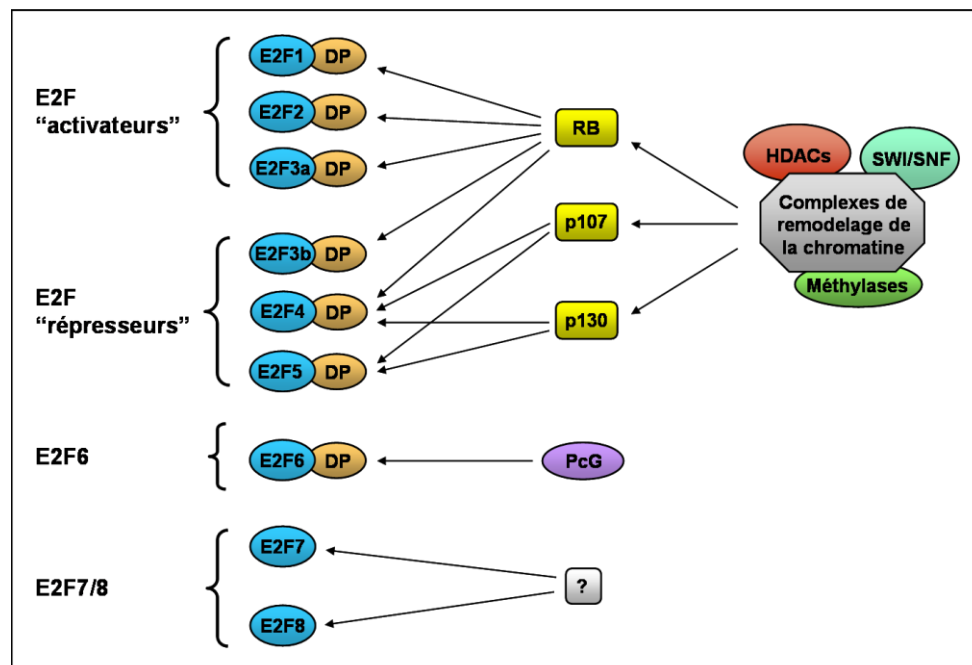
Le domaine de liaison à l'ADN (en rouge) est conservé chez tous les membres de la famille. Les E2F1-6 possèdent un domaine de dimérisation avec DP (en vert). Les E2F1-5 renferment également un domaine de transactivation (en gris) englobant le domaine de liaison aux membres de la famille RB (en jaune). Les E2F7 et E2F8 semblent interagir avec l'ADN indépendamment des protéines DP. Les E2F1-3 comportent en plus un signal de localisation nucléaire (NLS). Il existe deux isoformes E2F3 dénommées E2F3a et E2F3b, et plusieurs isoformes de E2F6 et E2F7 qui ne sont pas mentionnées ici.

*D'après Tsantoulis & Gorgoulis, 2005; DeGregory & Johnson, 2006; Iaquina & Lees, 2007.*

### I.1.3 Les différents sous-groupes de la famille E2F

En général, les protéines E2F1, E2F2 et E2F3a sont considérées comme des membres « activateurs », sur la base de leur capacité à activer la transcription de gènes cibles. Ces protéines se complexent exclusivement avec la protéine RB (**Figure 2**) et sont périodiquement exprimées au cours du cycle cellulaire avec un pic durant la transition G1/S.

Les protéines E2F3b, E2F4 et E2F5 sont décrites comme des « répresseurs » car leur principale fonction serait de réprimer la transcription des gènes cibles. A la différence des facteurs activateurs, les membres de ce groupe sont exprimés de façon constante au cours du cycle cellulaire. E2F4 peut lier tous les membres de la famille RB, alors que E2F5 interagit seulement avec p107 et p130, et E2F3b uniquement avec RB (**Figure 2**). Les protéines E2F6, E2F7 et E2F8 fonctionnent aussi comme des répresseurs transcriptionnels, mais de façon indépendante des membres de la famille RB. E2F6 réprime la transcription de gènes cibles des E2Fs dans les cellules quiescentes, vraisemblablement via son association avec les protéines du groupe Polycomb (PcG) (Trimarchi *et al*, 2001; Ogawa *et al*, 2002). Elle serait également impliquée dans la régulation négative de la transcription du gène suppresseur de tumeur BRCA1 (Oberley *et al*, 2003). Les protéines E2F7 et E2F8 sont encore mal connues mais semblent exercer leur activité répressive d'une manière similaire à celle de E2F6 (DeGregori & Johnson, 2006; Iaquinta & Lees, 2007). De part leur effet répresseur sur des gènes cibles du cycle cellulaire, elles seraient impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire (de Bruin *et al*, 2003; Christensen *et al*, 2005; Logan *et al*, 2005). Cette hypothèse est également soutenue par le fait que E2F7 et E2F8 répriment des gènes cibles de E2F1 (Zalmas *et al*, 2008).



**Figure 2 : Organisation du réseau E2F/RB chez les mammifères.**

La famille E2F peut être divisée en quatre sous-groupes en fonction de leur régulation par la famille des protéines RB et les complexes de remodelage de la chromatine.

*Adapté d'après Attwooll et al, 2004; Dimova & Dyson, 2005.*

Cependant, au vu des données actuelles de la littérature, la classification des E2Fs en éléments « activateurs » ou « répresseurs » de la transcription apparaît aujourd'hui beaucoup trop simpliste. Ainsi, des données issues d'analyses transcriptomiques montrent que la surexpression de membres activateurs comme E2F1 réprime un certain nombre de gènes cibles (Muller *et al*, 2001; Young *et al*, 2003). En outre, E2F1 s'associe avec la protéine RB au sein d'un complexe répresseur de la transcription au niveau des promoteurs de divers gènes cibles en fin de phase G1 et S (Wells *et al*, 2003; Iwanaga *et al*, 2006). Dans certains cas, E2F1 agit aussi comme répresseur transcriptionnel par un mécanisme direct et indépendant de RB (Koziczak *et al*, 2000). D'autre part, la surexpression des protéines E2F4 et E2F5 peut conduire à leur interaction avec certains co-activateurs transcriptionnels. Dans ce contexte, ces protéines connues comme répresseurs transcriptionnels deviennent capables de stimuler l'activité des promoteurs de gènes cibles des E2Fs (Balciunaite *et al*, 2005). D'une manière générale, il est donc vraisemblable que l'effet activateur ou répresseur des protéines E2Fs dépend du type de promoteur ciblé, des interactions avec d'autres facteurs et du contexte cellulaire et/ou tissulaire.

## **I.2. Activités biologiques de E2F1 et régulation de ses fonctions**

Dans un premier temps, E2F1 a été identifiée pour son rôle important dans la progression du cycle cellulaire, notamment via la régulation positive de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN. L'apparition de nouvelles technologies telles que les puces à ADN, la technique d'immunoprécipitation de la chromatine et la bioinformatique, a considérablement élargi le nombre et la nature des gènes potentiellement régulés par E2F1. Cette diversité de fonctions s'étend des gènes régulateurs traditionnels de la transition G1/S à des gènes impliqués dans le point de contrôle mitotique, la réparation de l'ADN, l'apoptose, l'angiogenèse, la différenciation et le développement, aussi bien qu'à des gènes de fonction encore inconnue (pour revues, DeGregori, 2002; Stevaux & Dyson, 2002; Dimova & Dyson, 2005; DeGregori & Johnson, 2006). La suite de ce chapitre sera consacrée aux découvertes majeures qui ont contribué à la complexité actuelle du réseau transcriptionnel de E2F1.



## I.2.1 E2F1 et contrôle du cycle cellulaire

### I.2.1.1 Vue traditionnelle de la fonction de E2F1 : contrôle du passage en phase S

La capacité de E2F1 à réguler la transition G1/S et l'entrée en phase S du cycle cellulaire a été mise en évidence par des études réalisées "*in vivo*" et "*in vitro*" en condition de surexpression et/ou de déplétion, grâce aux modèles animaux, et aussi par l'analyse après immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) des différents complexes E2Fs formés au niveau des promoteurs de différents gènes cibles. Chez la drosophile, la surexpression de l'activateur dE2F1 induit l'entrée ectopique des cellules en phase S (Asano *et al*, 1996; Du *et al*, 1996). Inversement, les drosophiles mutantes pour *de2f1* présentent une phase S réduite et de sévères retards de la croissance (Frolov *et al*, 2001). De plus, la déplétion de dE2F1 par ARN interférence dans les cellules de drosophile inhibe la réplication de l'ADN et provoque l'arrêt des cellules en phase G1 (Dimova *et al*, 2003). Chez les mammifères, la surexpression de E2F1 induit l'entrée en phase S de cellules quiescentes (Johnson *et al*, 1993; Shan & Lee, 1994), et l'expression ectopique de E2F1 entraîne l'entrée prématurée en phase S de fibroblastes murins immortalisés en l'absence de sérum (Lukas *et al*, 1996). Par ailleurs, E2F1 peut empêcher l'arrêt des cellules en phase G1 imposé par l'expression des inhibiteurs des CDK ou du TGF- $\beta$  (DeGregori *et al*, 1995a; Schwarz *et al*, 1995; Lukas *et al*, 1996; Mann & Jones, 1996). De façon importante, E2F1 régule positivement l'expression de gènes codant pour des enzymes nécessaires à la synthèse des nucléotides telles que la dihydrofolate réductase (DHFR), la thymidine kinase (TK) et la thymidylate synthase (TS), et pour des composants du complexe de reconnaissance des origines de réplication comme ORC1, CDC6, MCM2, MCM5 et MCM6 (Ohtani *et al*, 1996; Yan *et al*, 1998; Ohtani *et al*, 1999). Les gènes codant pour des composants de la machinerie de réplication elle-même sont également des cibles de E2F1, comme les sous-unités I et II de l'ADN polymérase  $\alpha$ , la topoisomérase II $\alpha$ , PCNA et la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase  $\delta$ . De plus, E2F1 régule l'expression d'un grand nombre de gènes codant des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire comme la cycline E, la cycline A, CDC2, p107, RB, c-myc, B-myb, ainsi que son propre promoteur (pour revue, Helin, 1998). L'ensemble de ces travaux supporte donc largement un rôle de E2F1 dans le contrôle du passage en phase S. Néanmoins, il a été montré que la surexpression de E2F1 ne conduit pas toujours à l'entrée des cellules en phase S. Dans certains cas, E2F1 peut inhiber la réplication de l'ADN après traitement aux rayons gamma (DeGregori *et al*, 1995b; He *et al*, 2000b). De plus, la surexpression de E2F1 induit la

sénescence de fibroblastes primaires humains, probablement via la régulation de l'expression de p14<sup>ARF</sup> (Dimri *et al*, 2000), et l'apoptose dans différents types cellulaires (pour revues, DeGregori, 2002; Trimarchi & Lees, 2002). Ces différentes données suggèrent que la capacité de E2F1 à induire l'entrée des cellules en phase S pourrait dépendre du contexte cellulaire (cellule normale versus cellule immortalisée par exemple).

A côté de son rôle au cours du passage en phase S, E2F1 participe aussi au contrôle de la transition G2/M via l'induction d'un certain nombre de gènes impliqués dans le processus mitotique (Ishida *et al*, 2001; Polager *et al*, 2002). De façon intéressante, l'activité transcriptionnelle de E2F1 diminue au cours de la phase S et cette inhibition permet le passage en phase G2 du cycle cellulaire (Krek *et al*, 1995).

### **I.2.1.2 Mécanismes moléculaires du contrôle de l'activité de E2F1 au cours du cycle cellulaire**

Sur le plan moléculaire, l'activité de E2F1 au cours du cycle cellulaire est finement régulée par son interaction avec différents partenaires protéiques, mais aussi par des modifications post-traductionnelles.

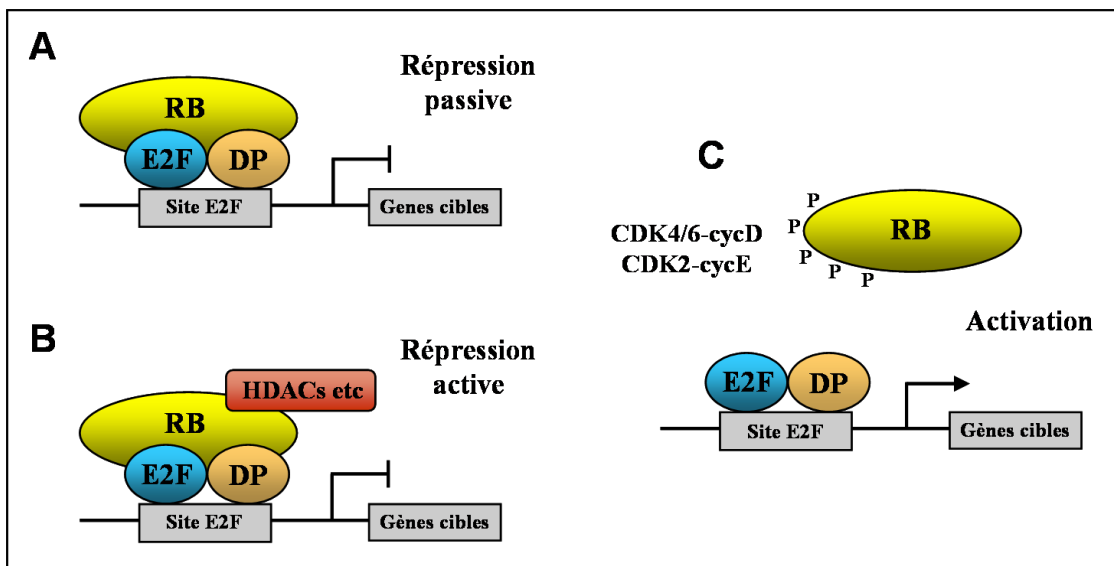
#### ***a) Répression de la transcription dépendante de E2F1 par la protéine RB***

L'activité transcriptionnelle de E2F1 est contrôlée au cours du cycle cellulaire par son association avec la protéine RB. Durant les phases G0 et G1, RB maintient E2F1 sous une forme transcriptionnelle inactive par deux mécanismes distincts : (i) un mécanisme dit de "répression passive" et (ii) un mécanisme dit de "répression active" (**Figure 3**). A l'heure actuelle, il est impossible de préciser quel mécanisme de répression est préférentiellement utilisé dans le contrôle du cycle cellulaire.

Dans le premier cas, RB bloque l'activité transcriptionnelle des hétérodimères E2F1/DP1 par encombrement allostérique, en masquant le domaine d'activation de E2F1 situé dans son extrémité C-terminale (Helin *et al*, 1993; Ross *et al*, 1999). Cette association prévient le recrutement du facteur basal de transcription TFIID, mais aussi de co-activateurs transcriptionnels tels que p300/CBP, GCN5, TRAPP et Tip60 (Trouche *et al*, 1996; McMahan *et al*, 1998; Ross *et al*, 1999; Lang *et al*, 2001; Taubert *et al*, 2004). RB peut

également réguler E2F1 à travers une interaction additionnelle qui inhibe la liaison à l'ADN de E2F1 (Dick & Dyson, 2003).

Dans le second cas, la liaison de RB à E2F1 convertit l'activité de l'hétérodimère E2F-DP d'activateur en répresseur actif de la transcription via le recrutement sur les promoteurs des gènes cibles de E2F1 de protéines possédant des activités histone déacétylase, histone méthyltransférase, ADN méthyltransférase ainsi que des activités de remodelage de la chromatine ATP-dépendant (pour revues, Harbour & Dean, 2000; Ferreira *et al*, 2001). La spécificité des complexes co-répresseurs recrutés par le complexe E2F-RB semble dépendre du type de promoteur et du contexte cellulaire (cellule quiescente versus cellule en prolifération par exemple) (Balciunaite *et al*, 2005).



**Figure 3 : Deux mécanismes de répression de la transcription dépendante de E2F par fixation de RB aux complexes E2F-DP au cours de la phase G0/G1 du cycle cellulaire.**

(A) Répression passive par fixation de RB au niveau du domaine de transactivation de E2F1, ce qui inhibe l'activation transcriptionnelle de E2F. (B) Répression active par recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine tels que les HDACs et modifications de l'extrémité N-terminale des histones au niveau des promoteurs de gènes cibles. (C) Les complexes CDK4/6-cycline D et CDK2-cycline E phosphorylent RB entraînant la libération de E2F et l'activation de ses gènes cibles.

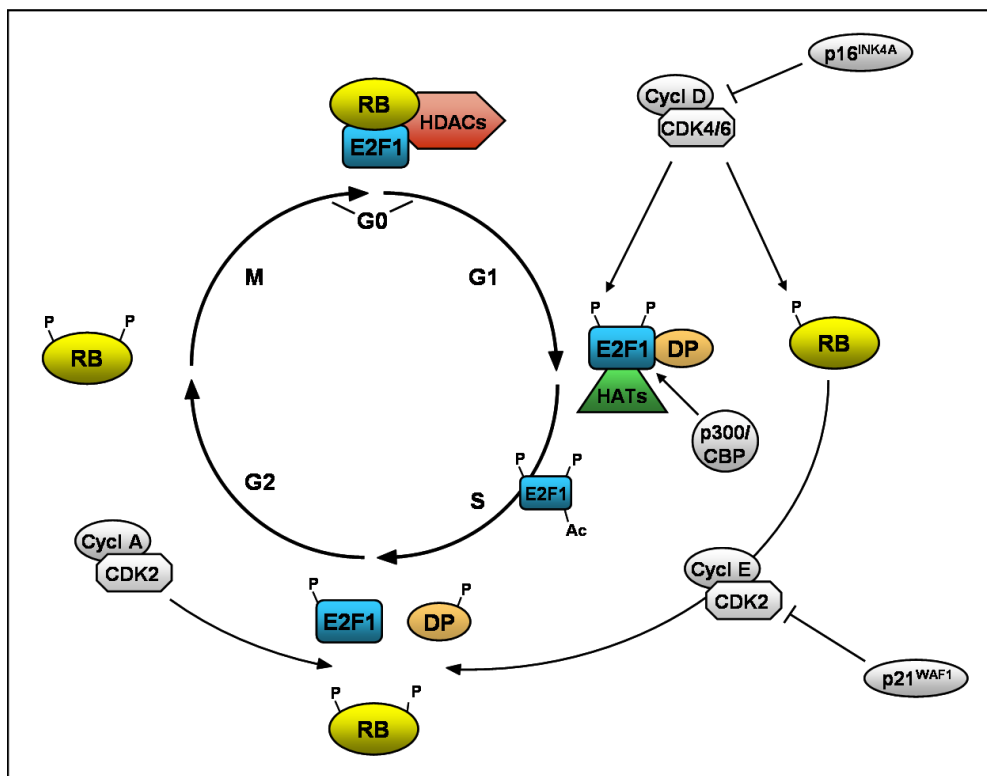
*D'après Bell & Ryan, 2004.*

### *b) Activation de la transcription dépendante de E2F1*

Au cours de la transition G1/S du cycle cellulaire ou lors de la ré-entrée en cycle de cellules quiescentes, les complexes E2F/RB subissent toute une cascade d'événements post-traductionnels qui vont permettre d'activer le programme transcriptionnel de E2F1 et d'induire le passage en phase S (**Figure 4**). Durant la phase G1, la protéine RB est hypophosphorylée ce qui lui confère la capacité de se complexer à E2F1 et de la maintenir

sous une forme inactive. En réponse à des signaux mitogènes, les complexes cycline D-CDK4/6 et cycline E-CDK2 phosphorylent RB en milieu et en fin de G1 respectivement (**Figure 4**). Il existe alors une accumulation de molécules E2F1 "libres" qui corrèle avec une activation de la transcription dépendante de E2F1.

A ce stade, la protéine E2F1 est à son tour phosphorylée par le complexe cycline D-CDK4/6 sur les résidus sérine en position 332 et 337 (Fagan *et al*, 1994). Ces phosphorylations augmentent sa stabilité et empêchent sa liaison à RB. E2F1, par une boucle de rétrocontrôle positive, est alors capable d'induire sa propre expression, ce qui représente un niveau supplémentaire de régulation de son activité au cours de la progression dans le cycle cellulaire.



**Figure 4 : Régulation de l'activité de E2F1 au cours du cycle cellulaire.**

La transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire est contrôlée par la voie E2F1/RB. En fin de phase G1, la phosphorylation séquentielle de RB par les complexes cycline D-CDK4/6 et cycline E-CDK2 entraîne la dissociation des complexes E2F1/RB. RB est maintenu sous une forme phosphorylée inactive jusqu'en fin de phase S. Au moment de la transition G1/S, E2F1 est phosphorylé par le complexe cycline D-CDK4/6 (Fagan *et al*, 1994; Mann & Jones, 1996), acétylé par p300/CBP (Martinez-Balbas *et al*, 2000; Tsantoulis & Gorgoulis, 2005), ce qui a pour effet d'accroître sa stabilité et d'empêcher sa liaison à RB, permettant ainsi l'accumulation des formes libres de E2F1 au point de transition G1/S. Ces étapes sont régulées négativement par les inhibiteurs des complexes cycline-CDK p16<sup>INK4A</sup> et p21<sup>WAF1</sup>.

Les mécanismes moléculaires de l'activation du programme transcriptionnel de E2F1 ne sont pas encore élucidés en détail. Cependant, les données disponibles indiquent que E2F1 sous sa forme libre recrute et interagit avec différents complexes co-activateurs à activité

histone acétyltransférase (HAT) (**Figure 4**). Il a ainsi été montré que l'activation de la transcription médiée par E2F1 corrèle avec l'induction par les HATs p300/CBP et PCAF de l'hyperacétylation des histones H3 et H4 au niveau de promoteurs cibles de E2F1 (Martinez-Balbas *et al*, 2000; Trouche & Kouzarides, 1996). Plus récemment, une interaction de E2F1 avec la HAT Tip60 a été décrite dans un modèle de surexpression. Dans ce système, l'expression ectopique de E2F1 induit le recrutement de Tip60 et de quatre autres membres de son complexe (TRRAP, p400, Tip48 et Tip49) au niveau de promoteurs régulés par E2F. De façon intéressante, l'acétylation de E2F1 par p300/CBP (Morris *et al*, 2000; Trouche & Kouzarides, 1996) ou Tip60 (Taubert *et al*, 2004) a été décrite comme stimulant son activité transactivatrice. Le rôle de cette acétylation dans le contexte du cycle cellulaire reste à démontrer. Enfin, d'autres types de protéines, telles que SP1, un facteur de transcription induit par les signaux mitogènes (Karlseder *et al*, 1996), le facteur de transcription GABP $\gamma$ 1 (Hauck *et al*, 2002) ou des facteurs de croissance (Black & Azizkhan-Clifford, 1999) interagissent spécifiquement avec E2F1 et régulent la transcription au niveau de promoteurs qui ne comportent pas les éléments consensus classiques des E2Fs.

### ***c) Inactivation de E2F1***

En milieu de phase S, le complexe cycline A-CDK2 interagit avec E2F1 via son domaine de liaison à la cycline A (Xu *et al*, 1994; Peeper *et al*, 1995). Le complexe cycline A-CDK2 induit parallèlement la phosphorylation du cofacteur DP, induisant la dissociation de l'hétérodimère E2F1/DP1 et la phosphorylation de E2F1 lui-même sur un résidu serine en position 375 (**Figure 4**). Cette phosphorylation diminue ainsi la capacité de liaison de E2F1 à l'ADN. Des données expérimentales avec un mutant de E2F1 incapable d'interagir avec le complexe cycline A-CDK2 suggèrent que l'inhibition de l'activité E2F1 est importante pour l'entrée en phase G2/M (Krek *et al*, 1995).

Le niveau d'expression de E2F1 est également contrôlé en seconde partie de phase S et en phase G2 du cycle cellulaire par sa dégradation par la voie du protéasome. Dans ce contexte, l'interaction directe de RB dans la région C-terminale de E2F1 le protège efficacement de la dégradation (Campanero & Flemington, 1997) et allonge de plus de deux fois la demi-vie du facteur. L'induction de l'expression de p14<sup>ARF</sup> (ou de son homologue murin p19<sup>ARF</sup>) ou de MDM2 entraîne en retour l'induction de la dégradation de E2F1 par le protéasome (Mundle & Saberwal, 2003; Rizos *et al*, 2007). A l'inverse, des modifications

post-traductionnelles à type de phosphorylation ou d'acétylation contribuent également à induire la stabilité et/ou l'accumulation de E2F1 "libre" dans la cellule par diminution de sa dégradation (Loughran & La Thangue, 2000).

### **I.2.2 E2F1 : un régulateur des processus apoptotiques**

Parallèlement à l'induction d'une entrée en phase S, il a été montré dans différents modèles expérimentaux que E2F1 peut induire la mort cellulaire par apoptose quand il est surexprimé ou activé par un dommage de l'ADN (Shan & Lee, 1994; Wu & Levine, 1994; Asano *et al*, 1996). Inversement, l'inactivation de E2F1 s'accompagne d'une résistance à la mort programmée dans certains types cellulaires. Plusieurs travaux montrent que cette fonction pro-apoptotique serait spécifique à E2F1 (DeGregori *et al*, 1997; Kowalik *et al*, 1998; Lissy *et al*, 2000) alors que d'autres suggèrent que E2F2 et E2F3 possèderaient aussi cette capacité (Vigo *et al*, 1999; Ziebold *et al*, 2001).

Les voies de signalisation pro-apoptotiques médiées par E2F1 sont multiples, interconnectées et coopèrent très probablement pour induire la mort cellulaire programmée. Elles impliquent les deux grandes voies apoptotiques que sont la voie intrinsèque mitochondriale et la voie extrinsèque des récepteurs de mort. Ainsi, parmi les nombreuses cibles transcriptionnelles de E2F1, on trouve des acteurs clés de la voie intrinsèque incluant des protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 comme PUMA, NOXA, et BIM (Hershko & Ginsberg, 2004), des protéines effectrices telles que APAF-1 (Moroni *et al*, 2001; Furukawa *et al*, 2002), ainsi que plusieurs membres de la famille des caspases (Nahle *et al*, 2002; Cao *et al*, 2004; Hershko & Ginsberg, 2004). Concernant la voie extrinsèque, plusieurs études impliquent le facteur de transcription E2F1 dans la voie médiée par l'activation du récepteur de mort FAS. Notre groupe a notamment montré que E2F1 sensibilise les cellules primaires et tumorales à l'apoptose médiée par le ligand FAS ou TRAIL, via l'inhibition de FLIP<sub>short</sub>, conduisant ainsi au recrutement de la caspase-8 au niveau du DISC et à son activation (Salon *et al*, 2006). Outre la stimulation directe de l'expression d'effecteurs pro-apoptotiques, E2F1 peut également inhiber des signaux anti-apoptotiques ou de survie, notamment le signal de survie associé au récepteur du TNF (Tumor Necrosis Factor) (Phillips *et al*, 1999).

Dans les modèles animaux comme dans les systèmes de culture cellulaire, E2F1 est capable d'induire l'apoptose de façon dépendante ou indépendante de la protéine p53 (pour

revues, Trimarchi & Lees, 2002; Bell & Ryan, 2004). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'induction de l'apoptose dépendante de p53. E2F1 stabilise p53 via l'activation transcriptionnelle de p14<sup>ARF</sup> (DeGregori *et al*, 1997; Bates *et al*, 1998; de Stanchina *et al*, 1998; Robertson & Jones, 1998). E2F1 est également capable dans des modèles murins et des fibroblastes humains d'engager un processus apoptotique via p53 et ce, en l'absence de p14<sup>ARF</sup>, suggérant l'existence de mécanismes alternatifs pour l'induction de p53 par E2F1 (Rogoff *et al*, 2002; Tolbert *et al*, 2002; Lindstrom & Wiman, 2003). En l'absence de p53, l'induction par E2F1 de l'expression de p73 conduit à l'apoptose de divers types cellulaires transformés ou non (Irwin *et al*, 2000; Lissy *et al*, 2000, Stiewe & Putzer, 2000).

Le rôle fonctionnel de E2F1 dans la réponse aux dommages de l'ADN a initialement été suggéré par des études décrivant l'augmentation rapide de son niveau d'expression protéique dans les cellules traitées par des agents induisant des dommages de l'ADN, et montrant que l'activité de E2F1 induite en réponse aux dommages de l'ADN peut résulter en l'apoptose (Huang *et al*, 1997; Blattner *et al*, 1999; O'Connor & Lu, 2000; Lin *et al*, 2001; Stevens *et al*, 2003). L'induction de E2F1 est liée en grande partie à une augmentation de la stabilité de la protéine en réponse à diverses modifications post-traductionnelles visant à limiter son « turnover ». Ainsi, il a été décrit une phosphorylation de E2F1 sur son résidu sérine en position 31 par les kinases détectrices de lésions ATM/ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated/Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related) (Lin *et al*, 2001) ainsi qu'une phosphorylation sur son résidu sérine en position 364 par la kinase effectrice CHK2 (Checkpoint Kinase2) (Stevens *et al*, 2003). De façon intéressante, la phosphorylation de E2F1 suite à une lésion de l'ADN est clairement connectée à l'accumulation du niveau protéique de E2F1 et à l'induction de l'apoptose (Lin *et al*, 2001; Stevens *et al*, 2003) (**Figure 5**). E2F1 est également la cible d'acétylation sur différents résidus lysine par P/CAF, dont l'activité HAT est stimulée en réponse aux dommages sur l'ADN. Il a été montré que cette acétylation affecte l'activité transcriptionnelle de E2F1 et favorise une réponse apoptotique via l'induction sélective de p73 (Pediconi *et al*, 2003). De plus, le traitement des cellules par l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II, induit une acétylation de E2F1 sur les résidus lysine 873/874 dans la région C-terminale qui inclue le site de liaison à RB (Rubin *et al*, 2005). Cette double acétylation a pour conséquence d'empêcher l'interaction RB/E2F1 et d'activer E2F1 (Markham *et al*, 2006). L'ensemble de ces données suggère que les processus de phosphorylation et d'acétylation de E2F1 pourraient jouer un rôle important au cours de la

réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, en régulant à la fois la stabilité et l'activité de E2F1.

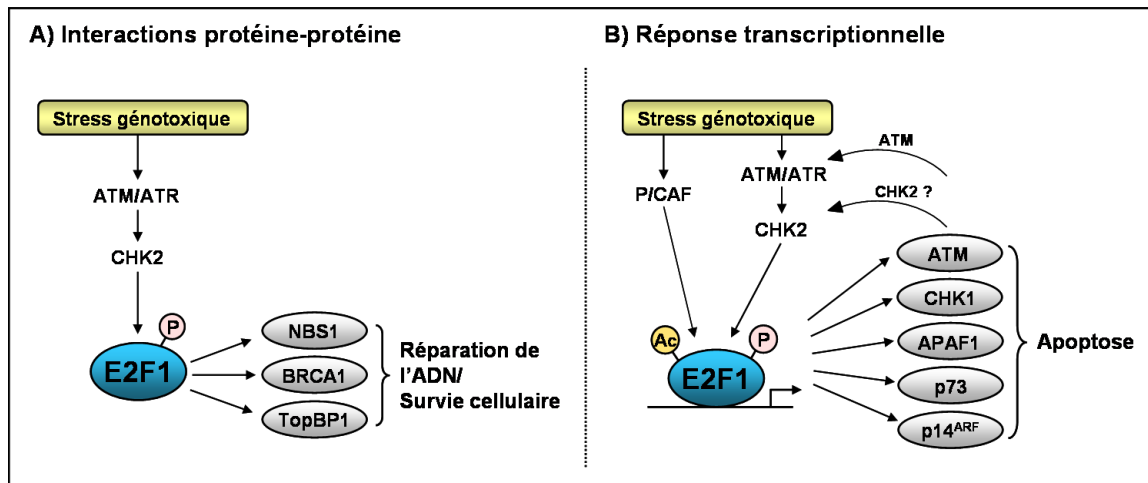
Parallèlement à ses fonctions pro-apoptotiques, des données plus récentes ont mis en évidence une activité anti-apoptotique E2F1. Ainsi, les résultats issus de l'inactivation ou de la surexpression de E2F1 dans des modèles murins montrent que E2F1 inhibe l'apoptose de kératinocytes induite par irradiation aux ultraviolets B (Wikonkal *et al*, 2003; Berton *et al*, 2005). D'autres expériences d'inactivation de E2F1 au cours du développement chez la drosophile démontrent également l'existence d'activités simultanées anti-apoptotiques et/ou pro-apoptotiques de E2F1 en fonction du type tissulaire envisagé (Dimova & Dyson, 2005; Moon *et al*, 2005). Ces données en apparence contradictoires rehaussent donc le caractère ambivalent de la protéine E2F1 qui ne peut être simplement classée comme pro- ou anti-apoptotique. Au contraire, les fonctions exercées par E2F1 sont complexes et dépendent bien du contexte tissulaire, cellulaire et du stimulus. Ainsi, dans un contexte de croissance normale ou en présence de facteurs de croissance, l'activation de E2F1 pourrait contribuer à la progression dans le cycle cellulaire plutôt qu'à la survenue de l'apoptose, sa capacité à activer des signaux anti-apoptotiques de survie contribuant à cet effet. Dans ce contexte, il a été montré que l'activité pro-apoptotique de E2F1 était neutralisée par activation de la voie de survie cellulaire RAS-PI3 Kinase (Hallstrom & Nevins, 2003; Hallstrom *et al*, 2008). De façon intéressante, il a aussi été montré qu'E2F1 active AKT (Chaussepied & Ginsberg, 2004), suggérant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle anti-apoptotique initiée par E2F1. A l'inverse, l'activation anormale ou inappropriée de E2F1 en l'absence de signaux de croissance pourrait conduire à l'apoptose. L'importance de cette balance prolifération/apoptose contrôlée par E2F1 dans le maintien de l'homéostasie tissulaire est attestée par des données récentes montrant qu'une altération de cet équilibre coïncide avec un mauvais pronostic dans les cancers du sein et de l'ovaire (Hallstrom *et al*, 2008).

### **I.2.3 Implication de E2F1 dans les processus de réparation des cassures de l'ADN**

Parallèlement aux fonctions apoptotiques de E2F1 en réponse aux dommages de l'ADN, des expériences de criblage des promoteurs possédant des sites de fixation à E2F1 ont permis d'identifier un grand nombre de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et la recombinaison (Ishida *et al*, 2001; Dimova *et al*, 2003). Les



données existantes montrent l'implication de E2F1 dans le déclenchement des points de contrôle permettant l'arrêt du cycle et la réparation de l'ADN (Huang *et al*, 1997, Lin *et al* 2001, Stevens *et al*, 2003). Ainsi, le groupe de Liu et coll. a montré qu'en réponse aux dommages de l'ADN, la protéine TopBP1 (DNA Topoisomerase II- $\beta$  Binding Protein1) se fixe à E2F1 phosphorylé par ATM et inhibe son activité transcriptionnelle pro-apoptotique et sa fonction proliférative (Liu *et al*, 2003a). E2F1 est également impliquée dans le recrutement du complexe de recombinaison/réparation des cassures double-brins de l'ADN MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) aux origines de réplication (Maser *et al*, 2001). De plus, l'augmentation de l'activité de E2F1 pourrait conduire à la transactivation de gènes codant pour des protéines de recombinaison, de réparation et de régulation des points de contrôle telles que CHK1 (Urist *et al*, 2004), BRCA1 (Wang *et al*, 2000a) ou les protéines de recombinaison homologue RAD51 et RAD54 (Ren *et al*, 2002) (**Figure 5**).



**Figure 5 : Rôle de E2F1 dans la réponse aux dommages de l'ADN.**

En réponse à un stress génotoxique, la protéine E2F1 est phosphorylée par les kinases ATM et CHK2 et/ou acétylée par l'acétyltransférase P/CAF en fonction du type de dommage subi par la cellule. Ces modifications conduisent à sa stabilisation et à une augmentation de son activité : E2F1 pourrait alors (A) participer au processus de réparation de l'ADN, activité qui aurait lieu indépendamment de son activité transactivatrice mais nécessiterait son interaction avec les protéines NBS1 (Nijmegen breakage syndrome), BRCA1 (breast cancer gene 1) ou TopBP1 (ADN topoisomérase II $\beta$  binding protein 1); (B) activer un panel de gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose, tels que les gènes codant ATM, CHK1, APAF1 (Apoptosis protease-activating factor 1), p73 et p14<sup>ARF</sup>, si les lésions sont irréparables.

*Adapté d'après Stevens & La Thangue, 2004.*

L'ensemble de ces constatations souligne l'ambivalence de E2F1 au cours de la réponse aux dommages de l'ADN en terme de réponse thérapeutique aux drogues cytotoxiques. En effet, si E2F1 est capable d'activer la réparation de l'ADN endommagé, il pourrait être un facteur contribuant à la chimiorésistance des cellules tumorales. A l'inverse, sa capacité à induire l'apoptose en réponse à des lésions de l'ADN pourrait sensibiliser les

cellules tumorales aux chimiothérapies. En accord, des essais précliniques ont montré la capacité de E2F1 à potentialiser les effets anti-tumoraux de divers agents cytotoxiques (Rodicker *et al*, 2001; Dong *et al*, 2002; Elliot *et al*, 2002; Ma *et al*, 2003).

#### **I.2.4 Contrôle des processus angiogéniques par E2F1**

Des travaux récents ont mis en évidence une nouvelle fonction anti-angiogénique de la protéine E2F1. En effet, Qin et collaborateurs ont montré dans des souris knock-out pour E2F1 l'existence d'une angiogenèse accrue en condition d'hypoxie, corrélée à une augmentation significative de l'expression de l'ARNm du VEGF-A comparativement aux souris sauvages. Dans des conditions d'hypoxie, E2F1 réprime l'activité du promoteur du VEGF par un mécanisme dépendant de p53 (Qin *et al*, 2006). Cette même équipe a caractérisé des sites spécifiques de liaison à E2F1 situés à proximité des sites SP1 sur le promoteur du VEGF. Dans une autre étude, le co-récepteur du récepteur VEGF-R2, NRP1 (neuropiline 1) a été identifié comme une cible transcriptionnelle directe de E2F1 (Jiang *et al*, 2007). Ces données connectent donc E2F1 et le contrôle du processus angiogénique, via une régulation du VEGF notamment.

### **I.3. Rôle ambigu de E2F1 au cours de la tumorigenèse**

Le rôle de certains membres E2Fs, dont E2F1, dans le processus de tumorigenèse a été initialement suggéré par les données issues de modèles "*in vitro*" montrant dans des tests de transformation de cellules en culture son pouvoir oncogénique (Johnson *et al*, 1994; Singh *et al*, 1994; Xu *et al*, 1995). Au cours de cette dernière décennie, le développement de modèles de souris transgéniques a permis de conforter le rôle critique qu'occupe E2F1 dans ce processus, mettant en évidence des fonctions très contrastées, oncogéniques ou suppressives de tumeur.

#### **I.3.1 Propriétés oncogéniques de E2F1**

Le modèle murin de tumorigenèse cutanée a été souvent utilisé pour l'étude des fonctions de E2F1 dans le développement tumoral. Dans ce modèle, le gène *e2f1* est sous le contrôle du promoteur du gène de la kératine 5. La pertinence de ce modèle animal réside

dans le fait que le promoteur de la kératine 5 n'est actif que dans les couches basales de l'épiderme et autres muqueuses malpighiennes (Ramirez *et al*, 1994; Pierce *et al*, 1998a). De façon importante, l'expression de ce transgène entraîne une hyperplasie épidermique et une hyperprolifération des cellules basales de l'épiderme (Pierce *et al*, 1998a). De plus, ces souris développent des tumeurs spontanées au niveau de la peau et d'autres tissus épithéliaux exprimant E2F1 (Pierce *et al*, 1999). Le développement tumoral est plus rapide et les tumeurs plus agressives lorsque p53 est inactivée, même partiellement (Pierce *et al*, 1998b). Un autre modèle de la capacité oncogénique de E2F1 a été établi au cours de la tumorigenèse hépatique. L'expression d'un haut niveau de E2F1 sous le contrôle d'un promoteur de l'albumine dans les hépatocytes conduit à la formation de tumeurs hépatiques, probablement en coopération avec le proto-oncogène c-Myc (Conner *et al*, 2000).

Les propriétés oncogéniques de E2F1 pourraient dépendre de sa capacité à stimuler la prolifération via la transactivation d'un certain nombre de gènes régulant la progression du cycle cellulaire et la réplication de l'ADN. Cependant, la surexpression dans des modèles transgéniques des protéines E2F1 ou E2F4 entraîne des niveaux similaires de prolifération cellulaire et d'hyperplasie tissulaire, mais seules les souris transgéniques E2F1 développent des tumeurs spontanées (Wang *et al*, 2000b). Il est donc probable que d'autres fonctions plus spécifiques à E2F1 contribuent à son activité oncogénique, dont notamment sa capacité à inhiber la différenciation cellulaire (Dicker *et al*, 2000), à inhiber l'apoptose (Wikonkal *et al*, 2003) ou à engendrer une instabilité génétique (Pickering & Kowalik, 2006).

### **I.3.2 Propriétés suppressives de tumeur de E2F1**

En accord avec l'ambivalence de ses fonctions rapportée « *in vitro* », E2F1 a également démontré des propriétés suppressives de tumeur dans des modèles murins, qui dépendraient très largement du type tissulaire et du contexte cellulaire. Ainsi, l'inactivation de E2F1 chez la souris prédispose au développement d'un certain nombre de tumeurs agressives, incluant des adénocarcinomes pulmonaires hautement invasifs, des lymphomes et des sarcomes de l'appareil génital (Yamasaki *et al*, 1996). La fréquence de formation de ces tumeurs est dix fois plus élevée chez les souris E2F1<sup>-/-</sup> que chez les souris sauvages (Yamasaki *et al*, 1996). D'autre part, il a aussi été décrit que la perte d'expression de E2F1 conduit à la mise en place d'une résistance à l'apoptose des thymocytes et une croissance thymique nettement majorée chez les jeunes animaux, allant de pair avec l'émergence de

thymomes et de lymphomes chez les souris plus âgées (Field *et al*, 1996). Les mécanismes par lesquels E2F1 exercerait ses fonctions suppressives de tumeur pourraient reposer sur sa capacité à induire l'apoptose, à stimuler l'entrée des cellules en sénescence prématurée (Russell *et al*, 2006), à contribuer au processus de réparation de l'ADN ou à inhiber l'angiogenèse.

### **I.3.3 Altération de l'expression de E2F1 dans les tumeurs humaines**

De nombreuses études ont mis en évidence une dérégulation de l'activité de E2F1 dans différents cancers humains, souvent corrélée à un mauvais pronostic. Cette dérégulation, associée soit à une amplification génique, soit à une altération de l'expression protéique, peut avoir un rôle causal dans ces tumeurs. Ainsi, l'amplification du gène *e2f1* a été décrite dans des métastases ganglionnaires de mélanomes (Nelson *et al*, 2006) et dans de rares cas de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (Gorgoulis *et al*, 2002). D'autre part, l'altération de l'expression protéique de E2F1 a été rapportée dans différents types de tumeurs malignes et de manière intéressante, en accord avec ses propriétés ambivalentes, l'expression protéique de E2F1 peut soit être augmentée, soit diminuée en fonction du type tumoral considéré. Ainsi, la protéine E2F1 est indétectable dans les cellules carcinomateuses prostatiques par rapport aux cellules du parenchyme prostatique normal (Zacharatos *et al*, 2004). Au contraire, de hauts niveaux d'expression de E2F1 sont observés dans les carcinomes du sein, du colon, de l'œsophage et de la vessie (Bramis *et al*, 2004; Ebihara *et al*, 2004; Zacharatos *et al*, 2004), ainsi que dans des glioblastomes (Alonso *et al*, 2005), comparativement au tissu normal associé. De façon importante, dans les cancers bronchiques, notre groupe a décrit une expression différentielle de E2F1 en fonction du type histologique considéré (Eymin *et al*, 2001). Ainsi, une surexpression de la protéine E2F1 est observée dans 90% des carcinomes pulmonaires à petites cellules, tandis que la protéine reste faiblement exprimée ou quasi indétectable dans 90% des adénocarcinomes pulmonaires et dans 82% des carcinomes malpighiens en comparaison avec le tissu pulmonaire normal. Ces résultats suggèrent un rôle ambivalent de la protéine E2F1 dans nos modèles d'études.

## II. EPISSAGE DES PRE-ARNm ET PROTEINES SR

### II.1. Généralités sur l'épissage

#### II.1.1 Définition de l'épissage

Chez les eucaryotes, les gènes nucléaires codant pour les protéines sont presque toujours constitués d'une suite de séquences codantes, appelées exons, interrompue par des séquences non codantes et non traduites qui doivent être éliminées (car elles contiennent entre autre des séquences répétées ou des codons d'arrêt de la traduction), dénommées introns. L'épissage constitutif est le processus nucléaire par lequel les séquences introniques des ARN pré-messagers (pré-ARNm) sont excisées et les séquences exoniques sont reliées les unes aux autres, pour former l'ARN messager (ARNm) mature. La maturation des ARNm requiert également l'ajout d'une coiffe en 5' du pré-ARNm ainsi que l'addition d'une séquence de polyadénylation appelée queue poly(A) en 3'. Ces ARNm sont ensuite transportés dans le cytoplasme pour y être traduits en protéines au niveau des ribosomes.

L'épissage est un phénomène largement répandu chez les eucaryotes supérieurs et pourrait concerner plus de 90 % des transcrits chez certaines espèces. Un gène typique de mammifère contient de 7 à 8 exons (donc de 6 à 7 introns) répartis sur environ 16 kb et produit un ARNm d'environ 2,2 kb. De manière générale, les exons sont relativement courts et encadrés par de longues séquences introniques. Ainsi, chez l'homme, la taille moyenne d'un exon varie de 75 à 150 nucléotides tandis que les introns font en moyenne 3500 nucléotides (Deutsch & Long, 1999), cette taille pouvant même atteindre 500 000 nucléotides dans certains cas extrêmes (Rowen *et al*, 2002). On peut donc imaginer le défi relevé par la machinerie de l'épissage pour reconnaître les exons au sein du génome.

A côté de l'épissage constitutif éliminant les introns, il existe un second mode d'épissage dénommé alternatif. En effet, chez les vertébrés, les sites d'épissage sont généralement dégénérés par rapport aux séquences consensus. De ce fait, différentes séquences alternatives peuvent être utilisées en tant que sites d'épissage et plusieurs ARNm peuvent ainsi être générés à partir d'un seul gène. L'épissage alternatif est semblable à

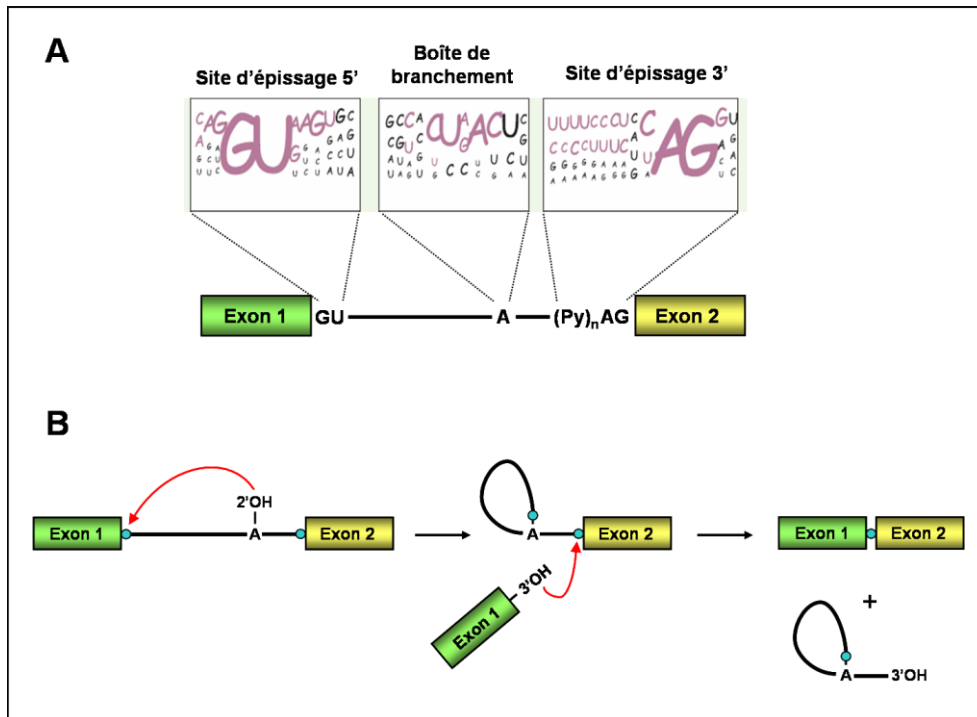
l'épissage constitutif et met en jeu les mêmes acteurs moléculaires mais dans ce cas, des séquences exoniques peuvent aussi être excisées. Les eucaryotes supérieurs et les virus utilisent l'épissage alternatif pour accroître la capacité codante de leur génome. Ce processus est considéré comme la source la plus importante de diversité protéique chez les vertébrés (pour revue, Black, 2000). Dans certains cas extrêmes, il permet à un seul gène de coder plus de protéines que tous les autres réunis. C'est le cas du gène *Dscam* de la drosophile qui contient 95 exons épissés alternativement et peut générer potentiellement plus de 38 000 isoformes protéiques différentes (Schmucker *et al*, 2000). Chez l'homme, l'épissage alternatif concerne plus de 70 % des gènes (Johnson *et al*, 2003) et permet d'expliquer la disparité numérique qui existe entre le faible nombre de gènes codant pour des protéines (environ 26 000) et le nombre de protéines humaines estimé à plus de 90 000 (Modrek & Lee, 2002). Près de 80% des événements d'épissage alternatif ont pour conséquence de modifier la séquence codante conduisant à la production de protéines distinctes. L'épissage alternatif représente donc une importante source de diversité fonctionnelle et joue un rôle fondamental dans le développement des cellules, l'organisation des tissus et même le développement d'un individu. Au niveau physiologique, il contrôle de multiples programmes cellulaires. En contrepartie, comme nous le verrons par la suite, il est aussi à l'origine de pathologies très diverses.

## **II.1.2 Mécanismes moléculaires de l'épissage**

### **II.1.2.1 Séquences nécessaires à l'identification et l'élimination d'introns**

Les introns renferment un ensemble de séquences conservées permettant leur reconnaissance par la machinerie d'épissage. Les séquences d'épissage constitutif sont relativement conservées et correspondent aux sites 5' donneur et 3' accepteur. A l'extrémité 5' de chaque intron se trouve le site 5' donneur d'épissage dont la séquence se rapproche du consensus CAG/GUGAGU (« / » = jonction intron/exon), le dinucléotide GU en 5' de l'intron étant le motif le plus conservé. La définition du site 3' accepteur d'épissage (situé à l'extrémité 3' de l'intron) est plus complexe. En effet, chez les vertébrés, il renferme la boîte de branchement, une séquence polypyrimidine et le site 3' proprement dit. La boîte de branchement est localisée à environ 40 nucléotides en amont du site 3' d'épissage. Chez les vertébrés, la séquence consensus établie pour la boîte de branchement est très dégénérée : YNYURAC (Y = pyrimidine) avec un résidu adénosine conservé qui joue un rôle central dans

la réaction d'épissage. La séquence polypyrimidine correspond à un enchaînement de 10 à 20 résidus pyrimidine, tandis que le site d'épissage 3' proprement dit situé à la jonction 3' intron/exon se caractérise par une courte séquence conservée YAG/G (Y = U ou C) (**Figure 6A**). En revanche, les sites alternatifs sont généralement moins conformes, ce qui les rend plus sensibles à une régulation par des éléments auxiliaires situés à proximité.



**Figure 6 : L'épissage, un processus en deux étapes qui requiert des séquences spécifiques.**

(A) Profil des séquences consensus au site d'épissage 5', au point de branchement et au site d'épissage 3'. La fréquence des 4 nucléotides A, C, G et T à chaque position est représentée par la taille des caractères. Les séquences les plus conservées sont les dinucléotides GU et AG, respectivement en 5' et en 3' de l'intron, et le nucléotide A au niveau du point de branchement. Les rectangles représentent les exons, et les traits pleins les introns. (Py)<sub>n</sub> : région riche en pyrimidines. (B) Réaction d'excision-épissage d'un ARN pré-messager. L'épissage d'un pré-ARNm se déroule en deux étapes successives, impliquant chacune une réaction de trans-estérification. Une molécule de pré-ARNm est représentée ici schématiquement avec un intron (trait noir) entouré par deux exons. Les deux étapes de la réaction impliquent des attaques nucléophiles (flèches rouges) sur les liaisons phosphodiester terminales (cercle bleu) par le 2' hydroxyle du point de branchement (A) et par le 3' hydroxyle de l'exon 5' respectivement. Les produits de cette réaction sont d'une part les deux exons ligaturés correctement et d'autre part, l'intron cyclisé au niveau de l'adénosine du point de branchement. En raison de sa forme particulière, cette forme de l'intron est appelée lasso ou lariat. Le lasso sera par la suite ouvert par une enzyme de débranchement en vue d'être recyclé.

### II.1.2.2 Processus réactionnel de l'épissage

La réaction d'épissage proprement dite s'effectue en deux temps (**Figure 6B**). Elle débute par une attaque nucléophile du 2'-OH du ribose de l'adénosine de la boîte de branchement sur le phosphate de la jonction exon-intron en 5'. Après cette coupure, le 3'-OH

libéré au niveau de l'exon situé en amont attaque le phosphate de la jonction intron-exon situé en aval. Les produits issus de cette réaction sont d'une part, les deux exons ligaturés correctement et d'autre part, l'intron cyclisé au niveau de l'adénosine de la boîte de branchement. En raison de sa forme particulière, cette forme de l'intron est appelée lasso ou lariat. Le lasso est finalement ouvert par une enzyme de débranchement afin de pouvoir être recyclé par des nucléases. L'excision et l'épissage représentent donc l'action conjointe d'enzymes et de ribozymes qui catalysent la coupure de l'ARN (endoribonucléases) et la fermeture de la brèche (ARN ligases).

### **II.1.2.3 Assemblage des complexes splicéosomaux et facteurs protéiques participant à cet assemblage**

La réaction d'épissage est catalysée et régulée par un complexe nucléaire sophistiqué appelé splicéosome (pour revue, Jurica & Moore, 2003). Cette structure dynamique comprend 5 particules ribonucléoprotéiques appelées UsnRNP (Uridine-rich Small Nuclear Ribonucleoparticle) et de nombreuses protéines non-snRNP. Les particules snRNP U1, U2, U4/U6, U5 sont 4 éléments majeurs pour la formation des complexes splicéosomaux. Chaque particule UsnRNP est constituée d'un ou plusieurs UsnRNA (Uridine-rich Small Nuclear Ribonucleic acid) entouré(s) d'un anneau heptamérique composé de 7 protéines communes, les protéines Sm, et d'un nombre variable de protéines spécifiques à chaque UsnRNP. Les UsnRNA sont des petits ARN de 100 à 300 nucléotides, riches en résidus uridine, très conservés chez les eucaryotes, et qui adoptent une structure secondaire et tertiaire caractéristiques.

Ces dernières années, de nombreux progrès ont été accomplis dans l'identification des composants des complexes splicéosomaux. Des analyses protéomiques ont permis la purification de certains de ces complexes et l'examen de leur contenu en protéines, y compris celles associées de manière transitoire (Hartmuth *et al*, 2002). Les complexes splicéosomaux s'assemblent autour de l'intron à éliminer de manière séquentielle et coordonnée. Chez les vertébrés, les premiers facteurs s'associant au pré-ARNm ont pour rôle de reconnaître les sites donneurs et accepteurs d'épissage. Une fois ces sites définis, les autres facteurs d'épissage s'assemblent à leur tour sur le pré-ARNm pour les étapes couplées d'élimination des introns et de ligation des exons flanquants.



Les études de l'assemblage des complexes splicéosomaux sur le pré-ARNm réalisées « *in vitro* » ont permis de mettre en évidence la formation de 5 complexes possédant une mobilité électrophorétique différente lorsqu'ils sont fractionnés par électrophorèse sur gel non dénaturant (Jurica *et al*, 2002) : les complexes H, E, A, B et C. Chacun de ces complexes correspond à l'assemblage ordonné de particules snRNP et de protéines non-snRNP. De nombreuses protéines splicéosomales n'appartenant pas aux particules UsnRNP participent également à l'assemblage des UsnRNP sur le pré-ARNm et s'associent aux complexes splicéosomaux de manière stable ou transitoire.

De façon remarquable, l'assemblage se fait par étapes. Il est initié par des associations stables de la particule snRNP U1 au niveau du site d'épissage 5' (Michaud & Reed, 1991), de la protéine SF1 au niveau de la boîte de branchement et du facteur auxiliaire U2AF au niveau de la séquence polypyrimidine. L'ensemble de ces protéines participe à la formation du complexe précoce ou d'engagement (complexe E). L'hydrolyse de l'ATP conduit ensuite à la formation du complexe A, lequel est caractérisé par l'association stable de la particule snRNP U2 au niveau de la boîte de branchement. Enfin, l'incorporation de la tri-snRNP (U4/U6•U5) au sein des complexes pré-splicéosomaux suivie de réarrangements structuraux massifs conduit à la formation des complexes catalytiques actifs B et C. C'est au cours de la formation de ces deux derniers complexes qu'à lieu la réaction d'épissage proprement dite (**Figure 6B**).

#### II.1.2.4 Les différents modes d'épissage alternatif

Parallèlement à l'épissage constitutif, des ARNm distincts peuvent être produits à partir d'un même gène par différents procédés. A ce jour, 5 types d'épissage alternatif ont été décrits dans la littérature (**Figure 7**).

Les exons dits « cassettes » : ils sont soit inclus, soit exclus de l'ARNm mature. Ils représentent les événements d'épissage alternatif les plus fréquents et sont en général de petite taille et exprimés de manière tissu-spécifique. De ce cas, l'utilisation des sites 5' et 3' correspondants est tissu-spécifique. Par exemple, le proto-oncogène c-SRC codant une tyrosine kinase subit un épissage tissu-spécifique. L'inclusion de l'exon N1 dans les neurones conduit à l'insertion de 6 acides aminés dans le domaine SH3 de la protéine kinase, ce qui affecte sa capacité d'interaction avec d'autres partenaires protéiques (pour revue, Brown & Cooper, 1996).

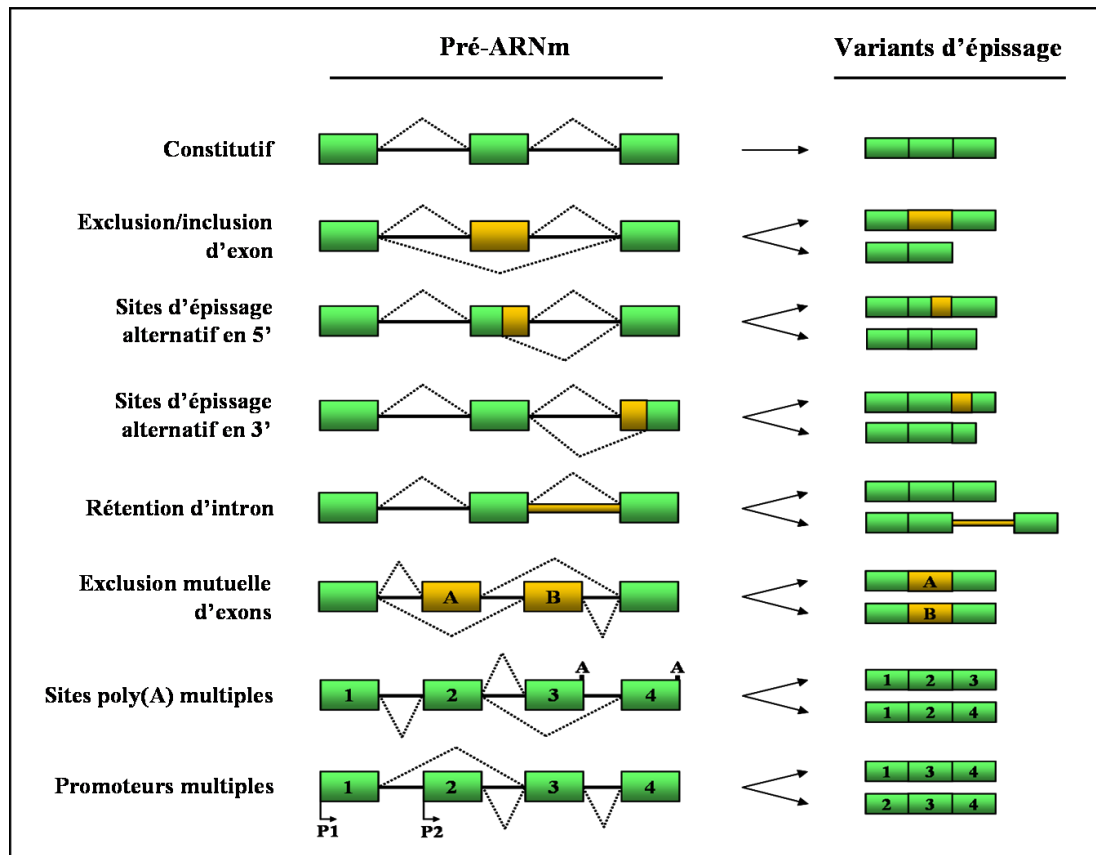
Les sites d'épissage 5' et 3' alternatifs : Plusieurs sites d'épissage 5' ou 3' alternatifs en compétition les uns avec les autres peuvent être présents dans une même séquence exonique. La sélection d'un des sites conduit à l'expression d'un des variants d'épissage de l'ARNm codant pour une isoforme protéique distincte. Ce système est largement utilisé par les virus (pour revue, Akusjarvi & Stevenin, 2003).

La rétention d'intron : Un intron peut être inclus dans l'ARNm. Dans ce cas, on parle de rétention d'intron. Cette rétention peut être tissu-spécifique. Chez la drosophile par exemple, l'épissage du 3<sup>e</sup> intron de l'élément P produit une transposase dans les cellules germinales, alors que sa rétention dans les cellules somatiques conduit à la production d'une protéine qui réprime la transposition (Laski *et al*, 1986).

Les exons dits mutuellement exclusifs : ils ne sont jamais présents ensemble dans les ARNm matures, bien qu'ils aient des sites 5' et 3' fonctionnels. Par exemple, les exons 2 et 3 du pré-ARNm de l' $\alpha$  tropomyosine de rat sont mutuellement exclusifs et leur inclusion est tissu-spécifique. En effet, l'exon 2 est utilisé exclusivement dans les cellules des muscles lisses tandis que l'exon 3 est utilisé dans les autres types cellulaires (Wieczorek *et al*, 1988).

Promoteurs ou sites de polyadénylation alternatifs : Le choix des promoteurs transcriptionnels et des sites de polyadénylation influence l'identité des exons terminaux d'un ARNm. Les gènes ayant des promoteurs multiples présentent une organisation propice à la régulation cloisonnée au niveau des différents tissus.

Typiquement, un pré-ARNm contenant plusieurs exons peut subir différents patrons d'épissage alternatif (pour revue Black, 2003). Le choix des sites d'épissage peut dépendre du type cellulaire, de l'état de différenciation de la cellule, de l'activation des voies de signalisation ou encore du sexe de l'individu. Tous les pré-ARNm qui subissent l'épissage alternatif présentent des sites d'épissage faibles.



**Figure 7 : Représentation des différents modes d'épissage alternatif et constitutif.**

Sont représentés en vert les exons constitutifs, en orange les exons alternatifs, et en traits pleins les introns. Différentes combinaisons d'assemblage des exons, voire de rétention d'intron sont possibles. En outre, l'épissage alternatif peut conduire à l'utilisation de sites de polyadénylation distincts. L'utilisation de promoteurs multiples peut également dicter le choix d'épissage.

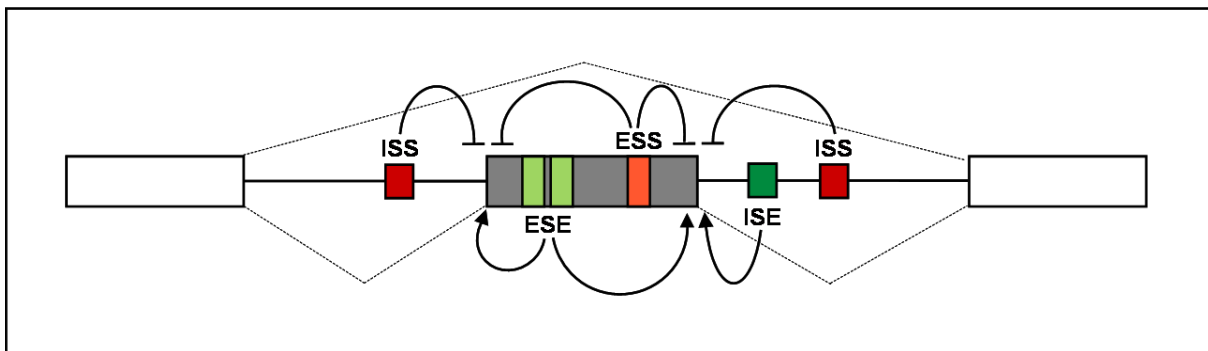
*Adapté d'après Blencowe, 2006.*

### II.1.3 Régulation de l'épissage alternatif

Les événements d'épissage alternatif ne doivent rien au hasard. Plusieurs études ont attesté de variations des profils d'épissage d'un même gène au cours du développement, selon le tissu ou l'activité cellulaire considéré, mais également en réponse à la stimulation par des facteurs de croissance tels que des cytokines ou des hormones. Ces données prouvent que l'épissage est un mécanisme finement régulé et que les signaux extracellulaires peuvent influencer sur l'apparition de tel ou tel transcrit. Cette régulation fait intervenir des séquences exoniques ou introniques agissant en "*cis*" et des facteurs protéiques liant ces séquences agissant en "*trans*".

### II.1.3.1 Des sites d'épissage sous-optimaux et des éléments de séquences régulatrices agissant en "cis"

Tous les pré-ARNm épissés alternativement possèdent la caractéristique d'avoir des sites d'épissage faibles ou sous-optimaux. A la différence des sites d'épissage forts utilisés constitutivement qui possèdent des séquences fortement similaires aux séquences consensus établies pour les sites d'épissage 5' et 3', les sites d'épissage sous-optimaux comportent fréquemment des séquences dégénérées par rapport aux séquences consensus. Ainsi, les sites 3' faibles ont souvent un enchaînement de pyrimidines entrecoupé de purines et/ou une séquence de branchement non canonique, parfois même l'adénosine qui sert au branchement est substituée par un autre nucléotide. Ces caractéristiques rendent moins efficace l'interaction des composants du spliceosome avec les séquences situées aux jonctions exon-intron et intron-exon. Dans ce cas, l'assemblage des complexes spliceosomaux est guidé et facilité par des facteurs protéiques qui se fixent à des éléments régulateurs présents à l'intérieur des exons et /ou des introns. Il existe deux types de séquences régulatrices : des séquences activatrices ESE (Exonic Splicing Enhancer) ou ISE (Intronic Splicing Enhancer) et des séquences inhibitrices ESS (Exonic Splicing Silencer) ou ISS (Intronic Splicing Silencer) (**Figure 8**).



**Figure 8 : Régulation de l'épissage alternatif par des séquences régulatrices.**

L'épissage alternatif est contrôlé par l'existence, au niveau du pré-ARNm, de séquences régulatrices définies sur la base de leur localisation et de leur activité. Il existe des séquences exoniques activatrices ESE (Exonic Splicing Enhancer) et inhibitrices ESS (Exonic Splicing Silencer), ainsi que des séquences introniques activatrices ISE (Intronic Splicing Enhancer) et inhibitrices ISS (Intronic Splicing Silencer). Les ESE et ISE fixent des protéines de la famille SR qui vont activer les sites d'épissage adjacents ou inhiber les séquences inhibitrices, tandis que les ESS et ISS répriment les sites d'épissage ou les séquences activatrices via la fixation des protéines de la famille hnRNP. Le choix des exons alternatifs (représentés ici en gris) dépend donc de la balance entre les éléments régulateurs sur le pré-ARNm et le ratio des protéines régulatrices interagissant avec eux.

*Adapté d'après Blencowe, 2006.*

Ces éléments régulateurs activateurs ou inhibiteurs agissent par l'intermédiaire de leurs partenaires protéiques. Ainsi, les protéines hnRNP sont la plupart du temps associées

aux séquences inhibitrices tandis que les protéines SR, comme nous le détaillerons plus tard, sont recrutées au niveau des séquences activatrices. Différentes approches, expérimentales et informatiques ont été développées pour identifier ces différentes séquences régulatrices (Fairbrother & Chasin, 2000; Zhang & Chasin, 2006). D'une manière générale, la distribution des séquences activatrices ou inhibitrices varie en fonction des exons constitutifs, des exons alternatifs et des introns. En effet, on trouve une forte proportion de séquences inhibitrices dans les introns tandis que les exons constitutifs sont riches en séquences activatrices. De façon intéressante, les exons alternatifs contiennent quasiment autant de séquences activatrices que des séquences inhibitrices (pour revue, Blencowe, 2006).

### II.1.3.2 Facteurs protéiques impliqués dans l'épissage et agissant en "trans"

Deux grandes familles protéiques jouent un rôle déterminant dans la régulation de l'épissage et le choix des exons à épisser : les protéines de la famille SR (Serine/Arginine-rich) et les protéines de la famille hnRNP (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein). Ces protéines influencent toutes, de façon dépendante de leur concentration, de leur localisation et/ou de leur activation, l'assemblage des complexes splicéosomiaux aux sites d'épissage, en interagissant avec d'autres facteurs d'épissage et/ou les séquences régulatrices présentes au niveau du pré-ARNm.

La famille des protéines hnRNP comprend une vingtaine de membres nommés hnRNP A1 à U (Choi & Dreyfuss, 1984), dont les plus représentés sont hnRNP A1, A2, B1, B2, C1 et C2. Elles sont très abondantes dans la cellule, jusqu'à 100 millions de copies par cellule. Ces protéines contiennent un ou plusieurs domaines de fixation à l'ARN appelés domaines RRM (RNA Recognition Motif) généralement localisés dans leur région N-terminale, ainsi que des domaines dits auxiliaires. Au sein du noyau, les protéines hnRNP sont majoritairement localisées dans le nucléoplasme. Certaines sont capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, comme c'est le cas de la protéine hnRNP A1 (Pinol-Roma & Dreyfuss, 1992). Les protéines hnRNP sont présentes sur chaque transcrite de gène codant une protéine et peuvent intervenir indirectement sur la maturation des transcrits. Elles peuvent également agir de manière spécifique sur la régulation de l'épissage alternatif d'un pré-ARNm en se fixant avec une très forte affinité sur les séquences régulatrices ESS et en réprimant l'épissage. La protéine hnRNPA1 est un régulateur négatif de l'utilisation des sites d'épissage, aussi bien 5' que 3'. Il a ainsi été montré qu'au niveau du site 5' d'épissage, la protéine hnRNPA1 est un antagoniste des activités des protéines SR (Mayeda & Krainer, 1992; Caceres *et al*, 1994).

A coté de la famille des protéines hnRNP, la famille des protéines SR joue un rôle clé au cours des différentes étapes du processus d'épissage. Ces protéines se caractérisent par un ou deux domaines de fixation à l'ARN, de type RRM, et un domaine RS riche en résidus sérine et arginine. Les protéines SR sont essentielles à la définition de l'exon chez les eucaryotes supérieurs (pour revue, Graveley, 2000), et sont aussi bien impliquées dans l'épissage constitutif que dans les régulations de l'épissage alternatif. Nous reviendrons dans un prochain chapitre sur cette famille de régulateurs clés de l'épissage.

A la lumière des données disponibles dans la littérature, il est manifeste qu'un jeu délicat existe entre les séquences agissant en "*cis*" et les facteurs agissant en "*trans*" pour moduler l'épissage des exons (pour revue, Smith & Valcarcel, 2000).

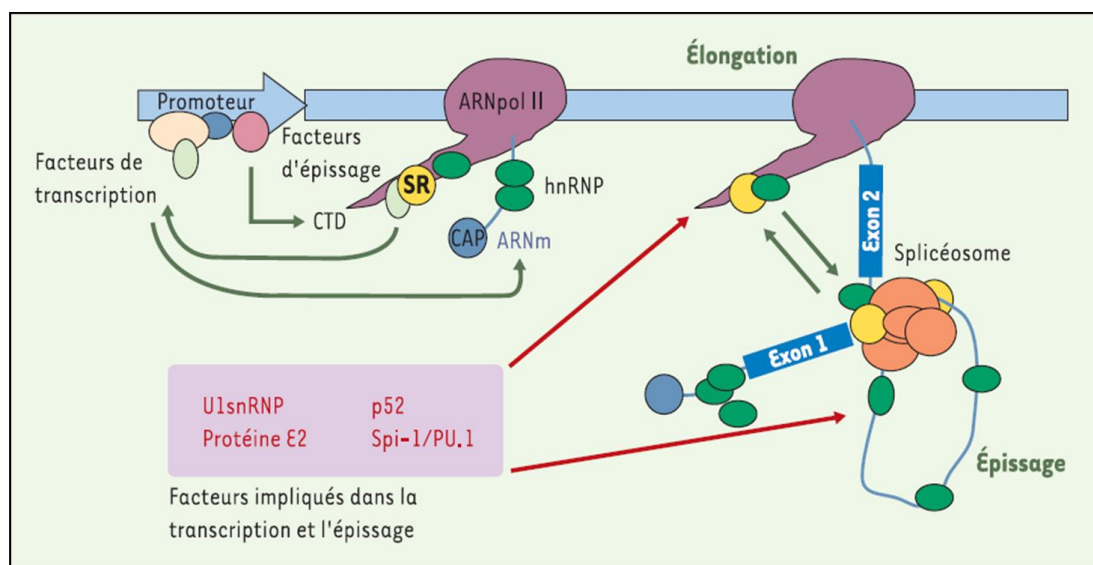
#### **II.1.4 Couplage entre transcription et épissage**

Initialement, il a été supposé que les molécules d'ARNm étaient épissées seulement après avoir été complètement synthétisées et libérées de la matrice ADN. Cependant, les points de vue actuels supportent largement le concept d'un couplage spatial et temporel entre la transcription et l'épissage qui apporte un niveau supplémentaire de régulation de l'épissage. Le couplage transcription/épissage s'appuie sur diverses constatations. Le premier argument historique en faveur du couplage transcription/épissage repose sur l'observation de la formation de boucles d'introns sur le pré-ARNm naissant durant la transcription de gènes embryonnaires chez la drosophile (Beyer & Osheim, 1988). Ainsi, l'épissage semble dans la plupart des cas être initié co-transcriptionnellement, avec une cinétique identique à celle de la transcription. Néanmoins, l'épissage co-transcriptionnel n'est pas obligatoire. Dans les gènes longs par exemple, certains introns peuvent être épissés de manière co-transcriptionnelle tandis que d'autres peuvent être excisés une fois la transcription terminée. Un second argument en faveur du couplage transcription/épissage est l'observation d'une co-localisation des acteurs moléculaires régulant ces deux processus. Ainsi, les facteurs d'épissage s'accumulent à proximité des sites de transcription actifs au sein de corps nucléaires appelées "speckles" (Huang & Spector, 1991), et le repérage des transcrits poly(A) avec une sonde oligo (dT) ou le marquage d'une sous-unité de l'ARN polymérase II ont révélé leur localisation dans les speckles (Carter *et al*, 1993; Mortillaro *et al*, 1996). De plus, plusieurs gènes se localisent à la périphérie ou à l'intérieur des speckles (Huang & Spector, 1991; Jolly *et al*, 1999; Brown *et al*, 2008). On peut également souligner le fait que certaines protéines

affichent une dualité de fonctions, en agissant sur les deux procédés à la fois, comme c'est le cas de l'activateur transcriptionnel E2 du papilloma virus humain (Lai *et al*, 1999) ou du co-activateur thermogénique PGC-1 (Monsalve *et al*, 2000). De façon intéressante, PGC-1 affecte l'épissage alternatif uniquement lorsqu'il est recruté au niveau des complexes interagissant avec les régions promotrices.

Un déterminant majeur de la coordination physique et fonctionnelle des étapes de transcription et maturation de l'ARNm est le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II. Constitué de 52 répétitions de la séquence consensus YSPTSPS chez l'homme, il agit comme une véritable plateforme de recrutement en fixant directement les facteurs des machineries de transcription et d'épissage. Par exemple, il a été mis en évidence l'interaction de l'ARN polymérase II avec les protéines de la famille SR (Das *et al*, 2007) ainsi qu'avec d'autres composants du splicéosome tels que U2AF et les différentes protéines snRNPs (Mortillaro *et al*, 1996; Robert *et al*, 2002; Kameoka *et al*, 2004). Ces interactions permettraient le positionnement des facteurs d'épissage à proximité étroite de l'ARN naissant, et favoriserait un épissage co-transcriptionnel plus performant (**Figure 9**). De façon importante, les changements dynamiques et séquentiels de la phosphorylation du CTD semblent jouer des rôles significatifs dans ce contexte. Pendant l'étape d'initiation de la transcription, lorsque l'ARN polymérase II est située sur des régions promotrices proximales, les séquences consensus du CTD sont phosphorylées sur la sérine en position 5 (S<sub>5</sub>). Par la suite, lorsque l'ARN polymérase II devient processive, la phosphorylation augmente sur la sérine en position 2 (S<sub>2</sub>), catalysée par le complexe kinase pTEFb. C'est à ce stade que le CTD peut interagir avec différents facteurs d'épissage et faciliter leur recrutement au niveau de l'ARNm naissant (Hirose & Ohkuman, 2007). En outre, des données suggèrent un rôle plus direct du CTD dans la reconnaissance de l'exon et conduisent à spéculer que le CTD ne serait pas seulement une plateforme de fixation des facteurs d'épissage, mais permettrait aussi le rapprochement et la juxtaposition d'exons consécutifs, facilitant ainsi l'assemblage du splicéosome (Zeng & Berget, 2000; Maniatis & Reed, 2002). De plus, la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II joue également un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif (Kadener *et al*, 2002; de la Mata *et al*, 2003; Kornblihtt, 2006). Ainsi, une ARN polymérase II peu processive ou faisant des pauses internes au cours de l'élongation offrirait un temps plus long pour la reconnaissance des sites d'épissage faibles par la machinerie d'épissage et favoriserait ainsi l'inclusion d'exons alternatifs. A l'inverse, une ARN polymérase II ayant une vitesse élevée ou ne faisant pas de pauses internes encouragerait l'exclusion d'exons

possédant des sites d'épissage sous-optimaux. Là encore, les changements dans la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II mettent en jeu des modifications de la phosphorylation de son domaine CTD (Batsche *et al*, 2006, Kornblihtt, 2006). Par exemple, il a été observé que le ralentissement de la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II au niveau du gène *CD44* s'accompagnait de la phosphorylation de la sérine en position 5 du CTD (Batsche *et al*, 2006). De plus, une étude récente a montré que la protéine SR SC35 régulaait positivement l'étape d'élongation de la transcription au niveau de gènes spécifiques via une augmentation de la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II au niveau de la sérine 2 (Lin *et al*, 2008).



**Figure 9 : Transcription et épissage, deux événements couplés pour un meilleur contrôle de l'expression génique.**

Outre la protéine oncogénique Spi-1/PU.1, plusieurs exemples de protéines impliquées dans les deux processus, transcription et épissage, sont déjà connus : P52, un activateur transcriptionnel, est capable d'interagir avec le facteur d'épissage SF2/ASF (Ge *et al*, 1998). snRNP U1, facteur d'épissage essentiel du spliceosome, peut se lier à plusieurs protéines impliquées dans la transcription: le facteur d'élongation TAT-SF1 (Fong & Zhou, 2001), le facteur général de transcription TFIIF, et même l'ARN polymérase II (Kwek *et al*, 2002). La protéine  $\epsilon 2$ , activateur transcriptionnel des gènes viraux, peut elle aussi interagir avec des facteurs d'épissage de la famille des protéines SR ou avec des protéines associées aux snRNP (Lai *et al*, 1999). CAP: capping de l'ARNm ; CTD: domaine carboxyterminal de l'ARN polymérase II.

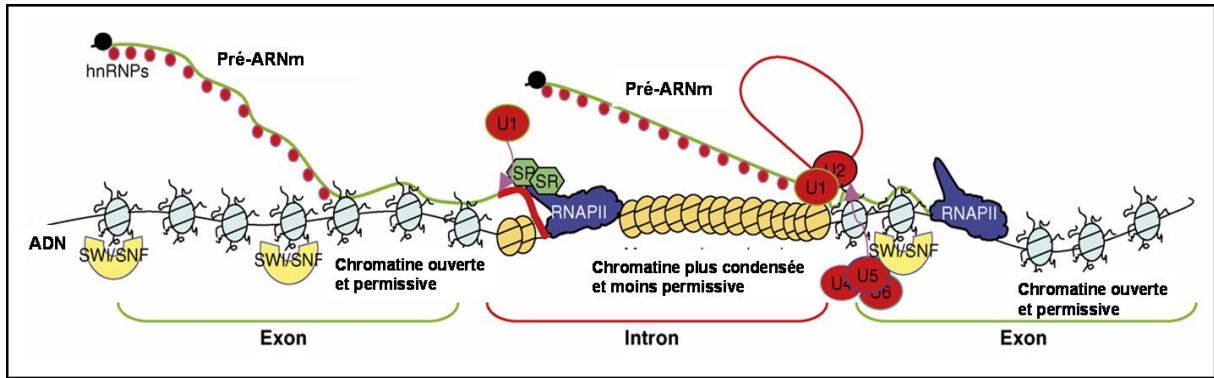
D'après Theoleyre & Baklouti, 2004.

Un autre argument en faveur du couplage entre transcription et épissage repose sur l'observation que les co-régulateurs transcriptionnels de certains facteurs de transcription recrutés au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles sont non seulement capables d'augmenter la quantité du transcrit, mais aussi de modifier la nature des variants d'épissage synthétisés par ces gènes (Auboeuf *et al*, 2002, 2004a, 2004b, 2005; Dowhan *et al*, 2005). Dans certains cas, les effets de ces co-régulateurs transcriptionnels sur l'épissage sont dépendants du promoteur. Ces données indiquent que l'épissage des transcrits pourrait aussi



être contrôlé par des facteurs de transcription. C'est le cas du facteur de transcription Spi-1/PU.1 (Hallier *et al*, 1998) qui régule l'épissage de façon dépendante de sa liaison au promoteur de ses gènes cibles (Guillouf *et al*, 2006) (**Figure 9**). Les facteurs de transcription peuvent également moduler la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II. Par exemple, le facteur de transcription oncogénique EWS-FLi1 affecte le ratio des variants d'épissage de la cycline D1 en diminuant la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II au niveau de ce gène (Sanchez *et al*, 2008). Finalement, ils peuvent recruter des facteurs de remodelage de la chromatine qui altèrent la structure chromatinienne, favorisant ainsi l'accès des composants splicéosomaux sur le pré-ARNm néo-synthétisé. Inversement, les protéines contrôlant l'épissage peuvent affecter la transcription. Ainsi, les travaux de Fong et Zhou ont montré que les particules snRNP du splicéosome interagissent avec le facteur de transcription et d'élongation TAT-SF1 et stimulent fortement l'élongation transcriptionnelle (Fong & Zhou, 2001). De même, la snRNP U1 s'associe au facteur général de transcription TFIID et régule l'initiation transcriptionnelle, en addition de son rôle dans l'épissage (Kwek *et al*, 2002) (**Figure 9**).

De façon importante, les données de la littérature les plus récentes indiquent que le couplage entre la transcription et l'épissage s'inscrit probablement dans un processus dynamique plus global où entre en jeu la structure de la chromatine. Plusieurs observations vont dans ce sens. L'épissage alternatif peut être régulé par les enzymes de remodelage de la chromatine. Par exemple, la trichostatine A (TSA), un puissant inhibiteur des histones déacétylases, favorise l'exclusion d'exons alternatifs, vraisemblablement via l'hyperacétylation de l'extrémité N-terminale des histones et l'accélération du passage de l'ARN polymérase II (Nogues *et al*, 2002). De plus, le complexe de remodelage SWI/SNF régule positivement l'inclusion d'exons alternatifs de divers gènes, incluant ceux codant pour les protéines d'adhérence E-cadhérine et CD44, le régulateur du cycle cellulaire cycline D1 ainsi que le facteur pro-apoptotique BIM (Batsche *et al*, 2006). Dans ce cas, la protéine BRM, la sous-unité ATPase du complexe SWI/SNF, interagit directement avec les complexes contenant les snARNs U1 et U5 de même qu'avec la protéine de liaison à l'ARN Sam68 (**Figure 10**). Enfin, il a été récemment rapporté un rôle de l'activité HAT de l'acétyltransférase GCN5 dans le recrutement co-transcriptionnel de la particule snRNP U2 au niveau de la boîte de branchement (Gunderson & Johnson, 2009).



**Figure 10 : Régulation de l'épissage du pré-ARNm par la structure chromatinienne et par les enzymes de remodelage de la chromatine.**

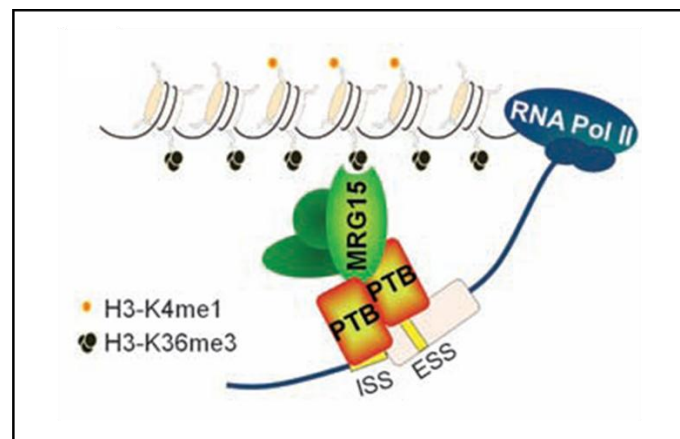
L'extrémité N-terminale des histones présente une haute affinité pour l'ARN du fait de sa charge positive. Le modèle présenté ici suggère que les queues N-terminales des histones pourraient capturer les molécules de pré-ARNm immédiatement après leur synthèse et les libérer seulement après leur prise en charge par les autres protéines de liaison à l'ARN. L'épissage serait ainsi facilité par les protéines régulatrices de la structure chromatinienne et les informations épigénétiques portées par les histones. Par exemple, le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF qui s'associe aux snRNAs (en particulier avec U5) pourrait aider au recrutement des complexes splicéosomaux au niveau de leurs substrats ARN. Les modifications des histones et le degré de compaction de la chromatine diffèrent entre introns et exons. Ces différences dans la structure chromatinienne pourrait influencer sur les interactions histone-ARN et aider la machinerie du splicéosome à reconnaître les séquences introniques.

*D'après Allemand et al, 2008.*

En accord avec un rôle de la structure chromatinienne « *per se* » dans le contrôle de l'épissage, deux études indépendantes ont récemment montré que les séquences ADN associées aux nucléosomes étaient préférentiellement localisées au niveau des exons (Schwartz *et al*, 2009; Tilgner *et al*, 2009). De façon remarquable, la longueur d'un seul tour d'ADN autour du nucléosome est la même que celle d'un exon humain typiquement reconnu par le splicéosome. Cette corrélation entre la distribution des nucléosomes et l'architecture exon-intron pourrait donc jouer un rôle critique dans la reconnaissance des exons au sein du pré-ARNm au cours de l'épissage co-transcriptionnel et supporte un modèle dans lequel les nucléosomes pourraient servir de « ralentisseurs » à l'ARN polymérase II au cours de l'élongation (**Figure 10**). Par ailleurs, des travaux récents ont démontré un enrichissement de la triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me3) au niveau des exons comparativement aux régions introniques (Kolasinska-Zwierz *et al*, 2009). Cette signature épigénétique exonique pourrait également contribuer au recrutement des facteurs d'épissage à la chromatine.

Cette dernière hypothèse a été confortée par des travaux montrant que deux facteurs d'épissage, les protéines SR SRp20 et SF2/ASF, interagissent avec les histones d'une manière dépendante de la phosphorylation de l'histone H3 sur sa sérine en position 10 (Loomis *et al*,

2009). Des expériences de FRET suggèrent une interaction directe possible du facteur d'épissage SC35 avec l'ADN (Sapra *et al*, 2009). Par ailleurs, plusieurs marques épigénétiques des histones faciliteraient le recrutement des facteurs d'épissage aux éléments régulateurs agissant en "cis" de l'ARN naissant et affecteraient la sélection des sites d'épissage. Ainsi, il a été montré que la protéine de reconnaissance de l'histone H3 triméthylée sur la lysine en position 4 (H3K4me3) CHD1 s'associe aux facteurs splicéosomaux et facilite leur recrutement au niveau des molécules d'ARN néo-synthétisées, potentialisant ainsi l'efficacité d'épissage (Sims *et al*, 2007). Dernièrement, une autre étude a montré que la protéine MRG15 qui se lie à l'histone H3 triméthylée sur la lysine en position 36 (H3-K36me3) interagit directement avec le régulateur d'épissage PTB (Polypyrimidine Tract Binding protein) et module la sélection des sites d'épissage dépendant de PTB (Luco *et al*, 2010). Ces travaux soutiennent l'existence de systèmes « adaptateurs », comprenant une ou plusieurs marques épigénétiques d'histones qui interagisse(nt) avec une protéine de liaison à la chromatine spécifique, elle-même interagissant avec une protéine impliquée dans la régulation de l'épissage (**Figure 11**). Ces données renforcent l'idée d'un rôle direct des modifications des histones dans le contrôle de l'épissage.



**Figure 11 : Modèle du recrutement des facteurs d'épissage par les modifications épigénétiques des histones durant la transcription.**

Le système dit « adaptateur » met en jeu une signature épigénétique des histones (H3-K36me3), une protéine de liaison à la chromatine (MRG15) et un régulateur d'épissage (PTB). Il permet la lecture des marques des histones par la machinerie du splicéosome et améliore l'efficacité de l'épissage du pré-ARNm et l'élongation de la transcription.

*D'après Luco et al, 2010.*

Ces différentes observations démontrent donc l'existence d'un couplage réciproque entre transcription et épissage et d'une interconnexion fonctionnelle reliant les protéines de ces deux machineries. Il est par conséquent possible que l'altération de l'un de ces deux

événements se répercute sur l'autre. De plus, ces interconnexions pourraient gouverner des événements d'épissage spécifiques d'un tissu, d'un stade de développement ou d'un état pathologique de la cellule.

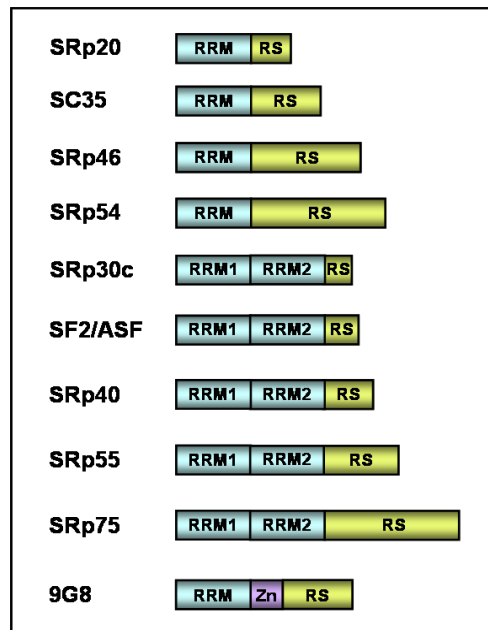
## II.2. Les protéines SR

Parmi toutes les protéines nécessaires à l'épissage, la famille des protéines SR joue un rôle crucial à la fois dans l'épissage constitutif et alternatif, et ce, depuis les étapes précoces de définition d'exon et d'assemblage des complexes splicéosomiaux, jusqu'à des événements post-épigage. La dénomination de ces protéines est liée à la présence d'un domaine C-terminal riche en enchaînements Sérine (S) – Arginine (R) appelé domaine RS. Découvertes initialement chez la drosophile (Amrein *et al*, 1988), ces protéines sont particulièrement bien conservées chez les métazoaires et les plantes, ainsi que chez certaines espèces d'eucaryotes inférieurs comme *Schizosaccharomyces pombe* (Gross *et al*, 1998).

### II.2.1 Présentation de la famille des protéines SR

Depuis 1991, dix protéines SR, avec des tailles variant de 20 à 75 kDa, ont été identifiées chez l'homme : SF2/ASF (Ge *et al*, 1991; Krainer *et al*, 1991), SC35 ou SRp30b (Fu & Maniatis, 1992a), SRp20 (Ayane *et al*, 1991), SRp30c, SRp40, SRp55 (Screaton *et al*, 1995), 9G8 (Cavaloc *et al*, 1994), SRp75 (Zahler *et al*, 1993), SRp54 (Chaudhary *et al*, 1991) et SRp46 (Soret *et al*, 1998) (**Figure 12**). Les protéines SR sont toutes abondantes, certaines sont même présentes à plus de  $10^7$  molécules par noyau de cellule. Chaque membre de la famille des protéines SR présente les critères suivants (Zahler *et al*, 1992) : (1) capacité d'induire l'épigage « *in vitro* » lorsque la protéine SR est ajoutée à un extrait cytoplasmique S100, déficient pour cette fonction, du fait de la présence en quantité très limitée des différents facteurs d'épigage ; (2) organisation structurale similaire comprenant un ou deux domaines de reconnaissance de l'ARN (RRM) en N-terminal et un domaine riche en enchaînements de dipeptides RS ou SR nommé domaine RS en C-terminal ; (3) reconnaissance par l'anticorps monoclonal mAb104 dirigé contre les phosphosérines, les sérines du domaine RS étant phosphorylées (Roth *et al*, 1990) ; (4) purification en chlorure de magnésium ; (5) conservation en taille et en séquence au cours de l'évolution. Selon que leur

domaine de fixation à l'ARN renferme respectivement un ou deux motifs RRM, les protéines SR sont sub-divisées en 2 sous-familles : (i) de type SC35 ou (ii) de type SF2/ASF.



**Figure 12 : Organisation structurale de la famille des protéines SR humaines.**

Les domaines structuraux des protéines SR sont représentés sur ce schéma. RRM = RNA Recognition Motif ; RS = domaines riches en résidus sérine et arginine ; Zn = motif en doigt de zinc.

Plus récemment, des études génomiques à large échelle ont permis d'identifier un grand nombre de protéines contenant un domaine RS. La plupart d'entre elles sont conservées chez les eucaryotes supérieurs et fonctionnent non seulement dans l'épissage du pré-ARNm ou dans le métabolisme de l'ARN, mais aussi dans d'autres processus cellulaires tels que le remodelage de la chromatine, la transcription et la progression du cycle cellulaire (Boucher *et al*, 2001). Cependant, de part leurs différences structurales, leur manque de reconnaissance par l'anticorps mAb104, ou l'absence d'un motif RRM, ces protéines ont été dénommées protéines SR-like ou SR-related (SRr). Certaines de ces protéines sont des facteurs d'épissage comme U2AF<sup>35</sup> et U2AF<sup>65</sup>, d'autres sont des protéines de particules snRNP (U1-70K, U5-100K et [U4/U6.U5]-27K), d'autres enfin sont des protéines régulatrices de l'épissage (hTra2 $\alpha$  et hTra2 $\beta$ ) ou des protéines co-activatrices (SRm160 et SRm130) (Blencowe *et al*, 1999). On trouve également dans cette catégorie des ARN hélicases (hPrp16, HRH1), et de manière intéressante, une famille de protéines kinases impliquée dans la phosphorylation du domaine RS des protéines SR (CLK/STY 1, 2, 3).

## II.2.2 Principales caractéristiques structurales des protéines SR

Les protéines SR ont une organisation structurale commune caractéristique (Graveley, 2000). Elles contiennent un ou deux domaines de liaison à l'ARN dans la région N-terminale dénommés domaines RRM, et un domaine riche en sérine et en arginine de longueur variable dans leur extrémité C-terminale appelé domaine RS. Les domaines RRM et RS sont modulaires. En effet, les domaines RRM peuvent être échangés entre les protéines SR (Chandler *et al*, 1997) et peuvent fixer l'ARN en l'absence du domaine RS (Zuo & Manley, 1993). Les domaines RS sont également interchangeables (Chandler *et al*, 1997; Wang *et al*, 1998a) et peuvent fonctionner même quand ils sont fusionnés à un domaine RRM hétérologue (Graveley & Maniatis, 1998). Les caractéristiques structurales d'une protéine SR entière n'ont pas encore été décryptées. Seule la structure des domaines RRM isolés a été analysée par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) et aucune information structurale détaillant le domaine RS n'est disponible à ce jour. Cela peut s'expliquer par la faible solubilité de ces protéines sous leur forme libre et l'état inconnu de phosphorylation des résidus sérines à l'intérieur du domaine RS.

### II.2.2.1 Le domaine RRM de fixation à l'ARN des protéines SR

Les domaines RRM (RNA Recognition Motif) sont les motifs structuraux de fixation à l'ARN les plus fréquemment retrouvés chez l'homme et ils déterminent la spécificité de liaison à l'ARN des protéines qui les renferment. Ces domaines contiennent environ 90 acides aminés et sont caractérisés par 2 séquences signature, l'une constituée de 8 résidus, RNP-1 (RGFGFVxF) et l'autre constituée de 6 résidus, RNP-2 (LFVGNL). L'unique domaine RRM de SC35 ainsi que le domaine RRM1 d'ASF/SF2 portent chacun les deux séquences signature et seraient capables de conférer une spécificité de sélection du site d'épissage (Dauksaite & Akusjarvi, 2004). Pour la majorité des protéines SR possédant deux domaines de liaison à l'ARN, le second ne correspond pas vraiment à la séquence consensus du RRM et fait référence au domaine RRM homologue (RRMH). La seule exception est la protéine 9G8 qui contient un domaine RRM et un domaine en doigt de zinc capable de s'associer à l'ARN (Cavaloc *et al*, 1994) (**Figure 12**).

De nombreuses études ont cherché à caractériser les séquences ARN reconnues par chacune des protéines SR (Tacke & Manley, 1995; Tacke *et al*, 1997; Liu *et al*, 1998; Cavaloc

*et al*, 1999; Liu *et al*, 2000). Plusieurs approches ont été développées et notamment la méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) qui implique la sélection des sites de fixation de haute affinité à partir d'un mélange de séquences ARN randomisées (Tuerk & Gold, 1990). Cette technique a permis l'identification de sites de fixation de haute affinité pour SF2/ASF et SC35 (Tacke & Manley, 1995), SRp40 (Tacke *et al*, 1997), ainsi que pour 9G8 et SRp20 (Cavaloc *et al*, 1999). Ces sites de fixation sont constitués de séquences riches en purines ressemblant aux séquences des sites d'épissages 5' ou aux séquences exoniques. De nombreuses approches bio-informatiques ont également été employées pour définir des séquences susceptibles de contrôler l'inclusion d'exon. La conclusion émanant de ces diverses expériences est que les protéines SR reconnaissent un large éventail de séquences ARN. Cependant, elles n'ont pas toutes la même spécificité de fixation à l'ARN et les séquences consensus qu'elles reconnaissent sont plutôt dégénérées. Ces informations témoignent donc d'une activité différentielle des protéines SR dans le contrôle de l'épissage alternatif (Tacke & Manley, 1999). Parallèlement à leur capacité à lier l'ARN, des études structurales plus récentes ont également montré que certains domaines RRM sont utilisés pour établir des interactions protéine-protéine (Maris *et al*, 2005).

### II.2.2.2 Le domaine RS des protéines SR

Le domaine C-terminal des protéines SR contient un grand nombre d'enchaînements de dipeptide RS (jusqu'à 80% dans le domaine de SC35). La longueur du domaine RS varie de 24 (SRp30c) à 316 résidus (SRp75). Il a été démontré que le domaine RS agit comme une plateforme d'interactions protéine-protéine. En effet, il participe aux interactions protéiques avec un grand nombre d'autres facteurs d'épissage contenant un domaine RS (Wu & Maniatis, 1993; Kohtz *et al*, 1994), comme les protéines SR-like (Blencowe *et al*, 1999), mais aussi avec d'autres facteurs de régulation de la machinerie d'épissage, tels que les protéines Tra, Tra2, U1-70K et U2AF<sup>35</sup> (Wu & Maniatis, 1993; Amrein *et al*, 1994; Kohtz *et al*, 1994). De façon intéressante, il a été montré que les domaines RS étaient suffisants pour médier ces interactions protéiques. Ces interactions impliquent des arginines chargées positivement et des sérines phosphorylées, indiquant clairement que la phosphorylation du domaine RS conditionne fortement les interactions des protéines SR avec leurs partenaires et donc leur activité (Graveley *et al*, 1998). Parallèlement, comme nous l'aborderons plus en détail dans la suite de ce chapitre, le degré de phosphorylation du domaine RS conditionne aussi la localisation sub-cellulaire des protéines SR, et notamment leur ciblage dans les speckles

nucléaires (Hedley *et al*, 1995; Caceres *et al*, 1997) ou leur recrutement au niveau des sites actifs de transcription (Misteli *et al*, 1998). Le domaine RS est aussi impliqué dans le transport noyau-cytoplasme de certaines protéines SR (Caceres *et al*, 1998) et dans la rétention nucléaire de la protéine SC35 (Cazalla *et al*, 2002). Enfin, des données récentes ont montré que le domaine RS peut aussi être en contact direct avec le pré-ARNm via la boîte de branchement et le site d'épissage 5', suggérant une voie alternative pour promouvoir l'assemblage du splicéosome (Shen *et al*, 2004). Ce domaine RS est donc essentiel à l'activation des protéines SR tant par les interactions protéine-protéine et protéine-ARN qu'il engage, que par son effet sur la localisation sub-cellulaire de ces protéines.

## II.2.3 Mécanismes d'action des protéines SR

### II.2.3.1 Rôle des protéines SR dans l'épissage constitutif et alternatif

Les protéines SR participent à de multiples étapes dans l'assemblage du splicéosome ce qui les rend essentielles, aussi bien dans l'épissage constitutif que dans l'épissage alternatif. Dans l'épissage constitutif, les protéines SR assurent un rôle de "ciment" dès les étapes précoces de l'assemblage des complexes splicéosomaux et contribuent aussi à la définition des exons et des introns (Sanford *et al*, 2005). Ces effets requièrent leur fixation via leur domaine RRM à des séquences exoniques spécifiques (rôle exon-dépendant), mais aussi leurs interactions via leur domaine RS avec des partenaires protéiques (rôle exon-indépendant).

#### a) Rôle dans l'épissage constitutif

La sélection des sites d'épissage est médiée par la fixation des protéines SR via leur domaine RRM sur les séquences exoniques activatrices (ESE) du pré-ARNm. Ainsi, au cours de la formation du complexe E, les protéines SR, notamment les protéines SF2/ASF et SC35, fixées sur leur ESE interagissent physiquement avec la protéine U2AF<sup>35</sup> via leur domaine RS, conduisant au recrutement de la sous-unité U2AF<sup>65</sup> sur l'enchaînement de pyrimidines localisé en amont du site 3' d'épissage de l'intron précédent (Tian & Maniatis, 1993; Wu & Maniatis, 1993). Par la suite, ce complexe stimule le recrutement de la protéine snRNP U1 sur le site d'épissage 5' en aval de l'exon (Graveley, 2000) (**Figure 13A**). Ainsi, les protéines SR fixées aux ESE fonctionnent comme des activateurs généraux pour permettre la définition de

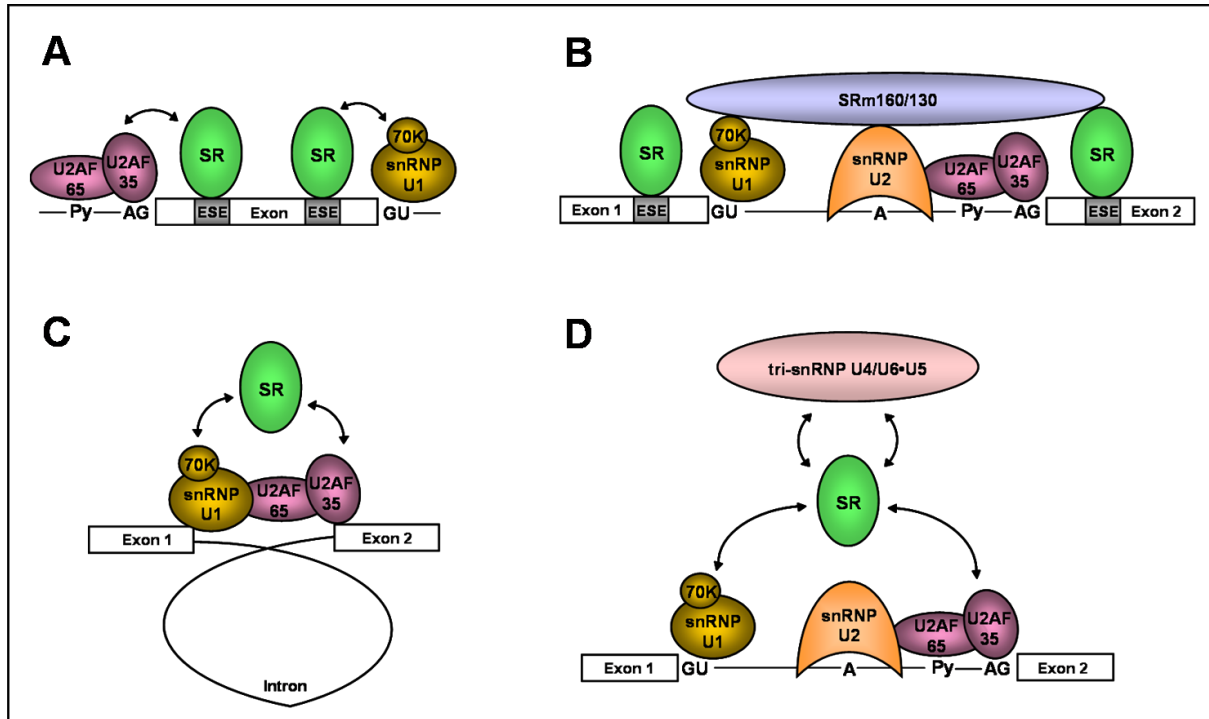


l'exon (Lam *et al*, 2002). Les analyses cinétiques ont démontré que l'activité relative des protéines SR fixées aux éléments ESE détermine l'amplitude de promotion de l'épissage. Cette activité dépend du nombre de protéines SR assemblées sur une séquence ESE donnée et de la distance entre cette séquence et l'intron. Il a également été montré que l'activation de l'épissage est proportionnelle au nombre de répétitions sérine-arginine retrouvées à l'intérieur du domaine RS de la protéine SR fixée. Ainsi, la quantité de répétitions sérine-arginine semble dicter l'activation potentielle des protéines SR (Graveley *et al*, 1998). L'activation de l'épissage par les éléments ESE peut aussi impliquer d'autres facteurs protéiques, en plus des protéines SR, tels que les co-activateurs d'épissage SRm160/300 ou la protéine Tra2 (Eldridge *et al*, 1999; Graveley, 2000) (**Figure 13B**). Ces co-activateurs favorisent et stabilisent les interactions entre les particules UsnRNP et les protéines initiées dans les premières étapes du processus d'épissage.

Les protéines SR régulent aussi l'épissage de manière exon-indépendante, c'est-à-dire via des mécanismes ne nécessitant pas leur interaction avec les séquences exoniques activatrices (ESE) (Hertel *et al*, 1999). Ainsi, il a été proposé que les protéines SR favorisent le rapprochement et l'appariement entre les sites d'épissage 5' et 3' de l'intron par un mécanisme nommé "cross-intron interaction", facilitant l'excision des introns de grande taille (Graveley, 2000). Cette idée est basée à l'origine sur l'observation que la protéine SR SC35 peut promouvoir l'interaction entre les particules snRNP U1 et U2 sur le pré-ARNm (Fu & Maniatis, 1992b). Ce modèle a par la suite été renforcé par l'observation que les protéines SR forment des "ponts" au travers de l'intron, via l'interaction simultanée de leur domaine RS avec d'autres protéines SR et les protéines U1-70K et U2AF<sup>35</sup>, composants fixés aux sites d'épissage 5' et 3', respectivement (Wu & Maniatis, 1993) (**Figure 13C**).

De plus, parallèlement à leur rôle dans la formation du complexe E, les protéines SR sont impliquées dans les étapes plus tardives de la réaction d'épissage, notamment dans l'incorporation du complexe protéique tri-snRNP U4/U6•U5 au sein du spliceosome (Rosigno & Garcia-Blanco, 1995; Tarn & Steitz, 1995) (**Figure 13D**). Même si le mécanisme exact de ce recrutement n'est pas encore complètement élucidé, il semblerait que les protéines SR interagissent avec deux protéines spécifiques de 65 et 110 kDa (Rosigno & Garcia-Blanco, 1995; Sanford *et al*, 2005) qui contiennent elles aussi un domaine RS (Teigelkamp *et al*, 1997). Enfin, les protéines SR sont requises pour l'épissage dit en "trans", une réaction dans laquelle les sites d'épissage 5' et 3' proviennent de molécules d'ARN distinctes (Bruzik & Maniatis, 1995; Chiara & Reed, 1995). De façon importante, les sites de

fixation aux protéines SR ne sont pas limités aux exons épissés constitutivement, mais concernent aussi les exons épissés alternativement. Il est donc vraisemblable que les protéines SR se fixent à la grande majorité, voire à la totalité des exons.



**Figure 13 : Activation de l'épissage par les protéines SR de manière exon-dépendante ou exon-indépendante.**

(A) Modèle du recrutement de U2AF. La définition de l'exon par U2AF au site d'épissage 3' et snRNP U1 au site d'épissage 5' est facilitée par la fixation des protéines SR aux éléments ESE. (B) Modèle de co-activation. Les protéines SR fixées aux ESE peuvent recruter des co-activateurs d'épissage SRm160/300 qui interagissent aussi avec les particules snRNP U1 et snRNP U2. Py : enchaînement de pyrimidines. (C) Modèle du "cross-intron interaction". Les protéines SR peuvent favoriser l'appariement des sites d'épissage 5' et 3' en interagissant simultanément avec snRNP U1 et U2AF au travers de l'intron. (D) Modèle du recrutement de tri-snRNP U4/U6•U5. Les protéines SR peuvent contribuer à l'incorporation de la particule tri-snRNP U4/U6•U5 au sein du spliceosome partiellement assemblé.

*D'après Graveley, 2000; Sanford et al, 2005; Shepard & Hertel, 2009.*

### ***b) Rôle des protéines SR dans l'épissage alternatif***

Certains exons alternatifs sont caractérisés par des séquences d'épissage sous-optimales, notamment au niveau de la boîte de branchement et de la séquence polypyrimidine au niveau du site 3' d'épissage. La fixation des protéines SR sur les séquences ESE peut compenser la faiblesse de ces séquences polypyrimidine en recrutant la protéine U2AF et en amorçant le processus de définition de l'exon (Blencowe, 2000). Par ailleurs, les protéines SR fixées sur des séquences ESE peuvent réguler l'inclusion d'exons alternatifs en supprimant l'effet négatif des protéines de la famille hnRNP fixées sur des séquences exoniques

inhibitrices (ESS). Plusieurs études ont permis de montrer que les protéines SR et hnRNP A/B inhibitrices agissent de manière antagoniste par un mécanisme dépendant de leur concentration (pour revue, Smith & Valcarcel, 2000). Leurs sites de fixation sur l'ARN sont généralement juxtaposés, ce qui, par encombrement stérique, empêche la fixation simultanée des 2 types de protéines. Ainsi, en l'absence de protéines SR sur les séquences ESE, la fixation de hnRNP A1 sur des séquences inhibitrices ESS de l'exon bloque le recrutement de la protéine U2AF au site 3' d'épissage et prévient l'inclusion de l'exon alternatif. De ce fait, le ratio entre les protéines SR et hnRNP A/B est d'une grande importance dans la régulation de l'épissage alternatif, et aurait un rôle crucial dans le contrôle de l'épissage alternatif régulé de manière tissu-spécifique ou au cours du développement.

De façon intéressante, certaines protéines SR peuvent parfois avoir des effets complètement opposés sur la sélection des sites d'épissage alternatifs. Par exemple, les protéines SF2/ASF et SC35 agissent de façon antagoniste dans la régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm de la  $\beta$ -tropomyosine (Gallego *et al*, 1997), où SC35 se comporte comme un répresseur de l'épissage d'une manière tissu-spécifique. Une autre étude plus récente montre aussi la capacité de SC35 et SF2/ASF à fonctionner comme antagonistes dans la régulation de l'épissage alternatif du gène codant pour l'hormone de croissance humaine. Dans ce cas encore, SC35 se comporte comme répresseur pour la sélection de l'exon 3 (Solis *et al*, 2008). Dans la régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm SRp20, SF2/ASF est antagoniste de SRp20 (Jumaa & Nielsen, 1997). Enfin, des données très récentes présentent les protéines SC35 et SRp40 comme des antagonistes de SF2/ASF et SRp55 dans le contrôle de l'épissage alternatif du pré-ARNm du médiateur de la coagulation TF, via un mécanisme de fixation compétitive au niveau de certains sites d'épissage (Chandradas *et al*, 2010).

Dans presque tous les cas, les protéines SR interagissent avec des séquences exoniques du pré-ARNm. Il existe cependant des exemples de fixation des protéines SR à l'intérieur des introns, où elles fonctionnent comme des régulateurs négatifs de l'épissage en interférant avec l'assemblage productif du spliceosome (Kanopka *et al*, 1996; Buratti *et al*, 2007). Ainsi, de manière analogue à certains facteurs de transcription, les protéines SR peuvent fonctionner selon le contexte, soit comme des régulateurs positifs, soit comme des régulateurs négatifs de l'épissage. Comme nous l'aborderons plus tard, la phosphorylation des protéines SR peut aussi conditionner leur effet répresseur versus activateur (Feng *et al*, 2008).

### II.2.3.2 Rôle des protéines SR dans les mécanismes cellulaires post-épissage

Un sous-groupe de protéines SR incluant SF2/ASF, SRp20 et 9G8, fait continuellement la navette entre le noyau et le cytoplasme (Caceres *et al*, 1998). De fait, ces protéines SR jouent un rôle non seulement dans les processus nucléaires d'épissage, mais également dans le transport et la traduction des ARNm épissés dans le cytoplasme (Caceres *et al*, 1998) (**Table 1**). Dans ce contexte, il a été démontré que les protéines SRp20, 9G8 et SF2/ASF stimulent l'export nucléo-cytoplasmique de l'ARNm en interagissant avec le récepteur d'export nucléaire des ARNm TAP/NFX1 et en facilitant l'interaction de l'ARNm épissé avec ce récepteur (Huang & Steitz, 2001; Huang *et al*, 2003). Par exemple, dans des cellules de mammifères et des ovocytes de Xénope, les protéines SR 9G8 et SRp20 favorisent l'export nucléaire de l'ARNm épissé de l'histone H2A en se fixant sur une séquence de 22 nucléotides de l'ARNm (Huang & Steitz, 2001). De plus, les protéines SR sont impliquées dans le contrôle de la stabilité des ARNm ainsi que dans la surveillance et l'élimination des ARNm anormaux. Le NMD (Non Sense Mediated mRNA Decay) est un mécanisme post-transcriptionnel utilisé par les cellules eucaryotes pour cibler et dégrader les ARNm anormaux présentant des codons stop prématurés, et ainsi éviter la synthèse de protéines tronquées pouvant avoir des conséquences néfastes sur la cellule. De façon intéressante, la surexpression de certaines protéines SR, incluant SF2/ASF, SC35, SRp40 et SRp55, stimule fortement le NMD (Zhang & Krainer, 2004). Cet effet nécessite la présence de leur domaine RS mais ne semble pas dépendre de leur capacité à faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, suggérant un rôle de ces protéines dans les étapes nucléaires du NMD. Les protéines SR modulent aussi la stabilité des ARNm indépendamment du mécanisme de NMD. Par exemple, la protéine SC35 présente à une concentration élevée contrôle la stabilité et le transport de l'ARNm de SV40 (Wang & Manley, 1995), et la protéine SF2/ASF régule la stabilité cytoplasmique de l'ARNm de PKCI-1 (Protein Kinase C-Interacting protein), via son interaction avec des séquences spécifiques du site 3' UTR de PKCI-1 (Lemaire *et al*, 2002).

Protéine SR	Epissage constitutif	Epissage alternatif	Répression de l'épissage	Navette nucléocytoplasmique	Export de l'ARNm	Stabilité de l'ARN	Dégradation des ARNm non-sens	Traduction de l'ARNm
SRp20	+	+	-	+	+	ND	-	-
9G8	+	+	-	+	+	ND	-	+
SRp30c	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
SF2/ASF	+	+	+	+	-	+	+	+
SC35	+	+	+	-	-	ND	+	-
SR38	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND
SRp40	+	+	-	-	ND	ND	+	-
SRp46	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
SRp54	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
SRp55	+	+	-	ND	ND	ND	+	ND
SRp75	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND

**Table 1 : Rôles des protéines SR dans les processus de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes.**

Les divers rôles décrits pour les protéines SR dans le métabolisme de l'ARNm indiquent que les membres de cette famille sont des acteurs multifonctionnels qui régulent aussi bien l'épissage et l'export des ARNm que leur traduction. (+): effet démontré ; (-): pas d'effet ; ND: effet non déterminé.

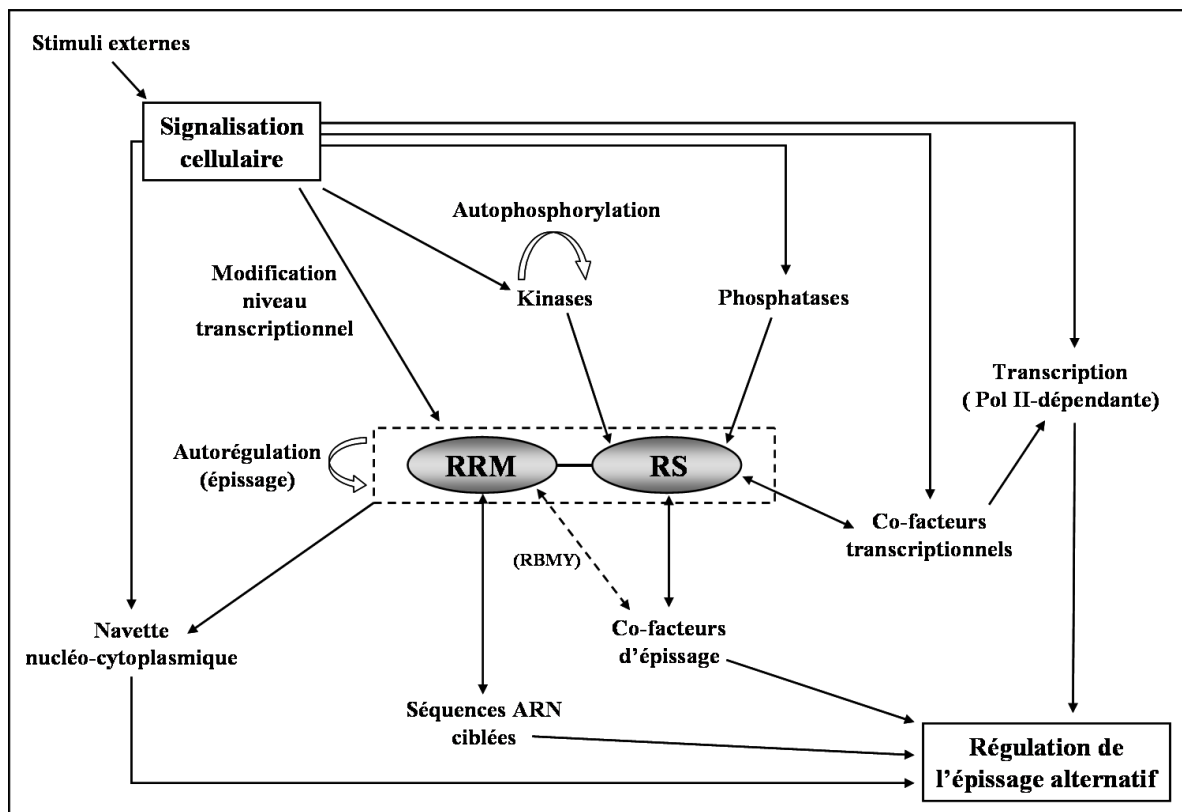
*Adapté d'après Sanford et al, 2005.*

Par ailleurs, les protéines SR participent activement au contrôle de la traduction des ARNm. Ainsi, SF2/ASF s'associe aux polyribosomes et améliore l'efficacité de traduction par un mécanisme mettant en jeu la phosphorylation de 4E-BP1, un inhibiteur de l'initiation de la traduction, via la voie de signalisation mTOR (mammalian Target of Rapamycin) (Sanford *et al*, 2004; Karni *et al*, 2008; Michlewski *et al*, 2008). De façon intéressante, SF2/ASF est capable de co-réguler l'épissage dans le noyau et la traduction dans le cytoplasme d'un même ARNm (Sanford *et al*, 2008), indiquant que les protéines SR peuvent agir à différentes étapes de l'expression génique d'un même gène. D'autres protéines SR jouent aussi un rôle dans la traduction. Ainsi, il a été montré que la protéine SRp20 potentialise la traduction d'un ARN viral initiée au site interne d'entrée des ribosomes dénommé IRES (Internal Ribosome Entry Site) (Bedard *et al*, 2007), tandis que la protéine 9G8 joue un rôle dans la traduction d'un ARNm non épissé contenant un élément de transport constitutif ou CTE (Constitutive Transport Element) (Swartz *et al*, 2007). Les protéines SR peuvent également influencer sur la traduction des ARNm de manière plus indirecte. Par exemple, la protéine SF2/ASF module l'épissage alternatif des pré-ARNm codant pour les kinases impliquées dans la régulation de l'initiation de la traduction que sont MNK2 [MAPK (mitogen-activated protein kinase)-interacting kinase 2] et S6K1 (S6 kinase 1) (Karni *et al*, 2007). Enfin, des données récentes impliquent les protéines SR dans le contrôle de l'expression de microARN (miARN). Ainsi, il a été montré qu'indépendamment de ses fonctions d'épissage, SF2/ASF se fixe directement au

transcrit primaire du miARN miR-7 et favorise sa maturation (Wu *et al*, 2010). L'ensemble de ces travaux atteste des rôles critiques joués par les protéines SR tout au long du cycle de vie des molécules d'ARNm.

## II.2.4 Régulation de l'activité des protéines SR

De nombreuses études ont montré que les résidus sérine au sein du domaine RS des protéines SR sont phosphorylés et déphosphorylés d'une manière dynamique, et ce, dans différents compartiments cellulaires. Ces cycles de phosphorylation/déphosphorylation des protéines SR contrôlent leurs interactions protéine-protéine et protéine-ARN au cours de la réaction d'épissage, mais affectent aussi leur localisation nucléaire et leur capacité à faire la navette noyau-cytoplasme (Lin *et al*, 2007; pour revue, Stamm, 2008) (**Figure 14**). « *In fine* », la balance phosphorylation/déphosphorylation conditionne donc l'activité globale des protéines SR.



**Figure 14 : Les protéines SR sont les acteurs majeurs d'un réseau de voies de signalisation conduisant à la régulation de l'épissage alternatif.**

Les protéines SR sont symbolisées par le rectangle central qui renferme le domaine de liaison à l'ARN (RRM) et le domaine RS représentés par des ovales. Les flèches doubles représentent les interactions développées par les différents domaines, soit avec l'ARN, soit avec d'autres protéines. L'interaction entre le domaine RRM et les co-facteurs d'épissage est représentée sous la forme d'une double flèche pointillée du fait que cette interaction n'a été décrite que pour le co-facteur RBMY.

#### **II.2.4.1 Rôle de la phosphorylation des protéines SR dans la réaction d'épissage**

La phosphorylation des protéines SR est essentielle aux étapes précoces de l'assemblage du spliceosome via la modulation des interactions des protéines SR avec les composants spliceosomaux mais aussi avec l'ARN. Ainsi, la phosphorylation de SF2/ASF conditionne à la fois sa capacité à interagir avec l'ARN et avec U170kDa permettant la reconnaissance efficace des sites d'épissage (Xiao & Manley, 1997), alors que sa déphosphorylation détermine le bon déroulement de la réaction catalytique d'épissage après assemblage du spliceosome (Cao *et al*, 1997). En accord avec ces données, le traitement d'extraits nucléaires par des inhibiteurs de phosphatases n'empêche pas l'assemblage du spliceosome mais bloque complètement la réaction d'épissage (Mermoud *et al*, 1994). Ces études indiquent qu'un cycle dynamique de phosphorylation/déphosphorylation est nécessaire à la réaction d'épissage. D'ailleurs, le maintien des protéines SR sous une forme hyper- ou hypophosphorylée inhibe leur activité biologique et la sélection d'exons alternatifs (Kanopka *et al*, 1998; Prasad *et al*, 1999; Sanford & Bruzik, 1999). La sélection du site d'épissage peut être aussi modulée en fonction du degré de phosphorylation des protéines SR. Par exemple, il a été montré chez la drosophile que la mutation d'une kinase affecte le choix du site 3' d'épissage (Du *et al*, 1998). Enfin, la phosphorylation détermine aussi le type d'activité des protéines SR. Ainsi, la phosphorylation de la protéine SR SRp38 qui possède des fonctions de répresseur distinctes des autres membres de la famille SR (Shin *et al*, 2005) la transforme en activateur d'épissage via la stimulation du recrutement des protéines snRNP U1 et U2 sur le pré-ARNm (Feng *et al*, 2008). L'ensemble de ces données témoigne donc d'un rôle critique du niveau de phosphorylation des protéines SR dans le contrôle de leur activité d'épissage mais aussi dans la détermination de leur spécificité. De plus, la phosphorylation de 9G8 ou SF2/ASF par la voie AKT affecte non seulement l'épissage, mais aussi la traduction de l'ARNm épissé (Blaustein *et al*, 2005), suggérant que la phosphorylation affecte aussi les activités post-épissage des protéines SR.

#### **II.2.4.2 Rôle de la phosphorylation dans la localisation sub-nucléaire des protéines SR**

Dans le noyau, les protéines SR sont dispersées dans le nucléoplasme, mais sont aussi enrichies dans des corps nucléaires appelés « speckles » ou encore « domaines SC35 » (Fu & Maniatis, 1990; Misteli *et al*, 1997; Hall *et al*, 2006). La localisation subnucléaire des

protéines SR dans les speckles et leur recrutement aux sites actifs de transcription dépend largement de leur degré de phosphorylation (Misteli *et al*, 1998). Par exemple, il a été montré que l'hyperphosphorylation des protéines SR par les kinases CLK/STY ou SRPKs provoque leur redistribution des speckles vers les zones actives en épissage, avec pour conséquence directe des changements dans la sélection des sites d'épissage (Wang *et al*, 1998b; Hartmann *et al*, 2001). A l'inverse, la phosphorylation des protéines SR en réponse à la surexpression d'AKT n'induit pas de désorganisation des speckles, ni de relocalisation des protéines SR dans le cytoplasme (Blaustein *et al*, 2005).

D'un nombre compris entre 20 et 50 par noyau, les speckles sont des structures hétérogènes qui varient par leur forme et leur taille (entre 0,5 et 3  $\mu\text{m}$ ) en fonction des caractéristiques métaboliques de la cellule. Dans les speckles sont concentrées environ 100 protéines différentes incluant des facteurs de transcription, d'épissage et de transport de l'ARNm. Après leur découverte, les speckles ont longtemps été considérés comme de simples sites de stockage des différents facteurs d'épissage (Zhang *et al*, 1994; Lamond & Spector, 2003). En effet, les premières études ont montré que la libération des protéines SR à partir des speckles dans le nucléoplasme via la phosphorylation de leur domaine RS est nécessaire à leur fonction d'épissage et à leur accumulation aux sites actifs de transcription (Caceres *et al*, 1997; Duncan *et al*, 1998; Misteli *et al*, 1998). Si ce modèle est sans doute valable pour un certain nombre de gènes, des études plus récentes suggèrent cependant un rôle beaucoup plus actif des speckles dans le couplage transcription/épissage (Hall *et al*, 2006; Stamm, 2008). Ainsi, l'expression de plusieurs gènes est directement associée à ces domaines nucléaires (Wei *et al*, 1999; Brown *et al*, 2008) qui semblent capables de lier d'une manière spatiale les processus d'expression et de maturation des pré-ARNm.

Selon le modèle le plus récent de la structure des speckles, les sites actifs de transcription et d'épissage des pré-ARNm se localisent à la périphérie des speckles dans des zones appelées « paraspeckles ». Ces régions sont significativement enrichies en ARN poly(A) et contiennent également différents facteurs d'épissage dont les protéines SR. Une fois épissé, l'ARNm mature diffuse vers l'intérieur des speckles et s'associe avec des facteurs d'export concentrés à ce niveau, permettant le transport de l'ARNm vers le cytoplasme. Par ailleurs, il a été mis en évidence la présence dans les speckles de certains facteurs impliqués dans les processus de NMD dont les protéines RNPS1 et Y14 (Gehring *et al*, 2005), suggérant que ces structures puissent aussi servir de sites « contrôle qualité » de l'ARNm avant son export vers le cytoplasme (Molenaar *et al*, 2004).

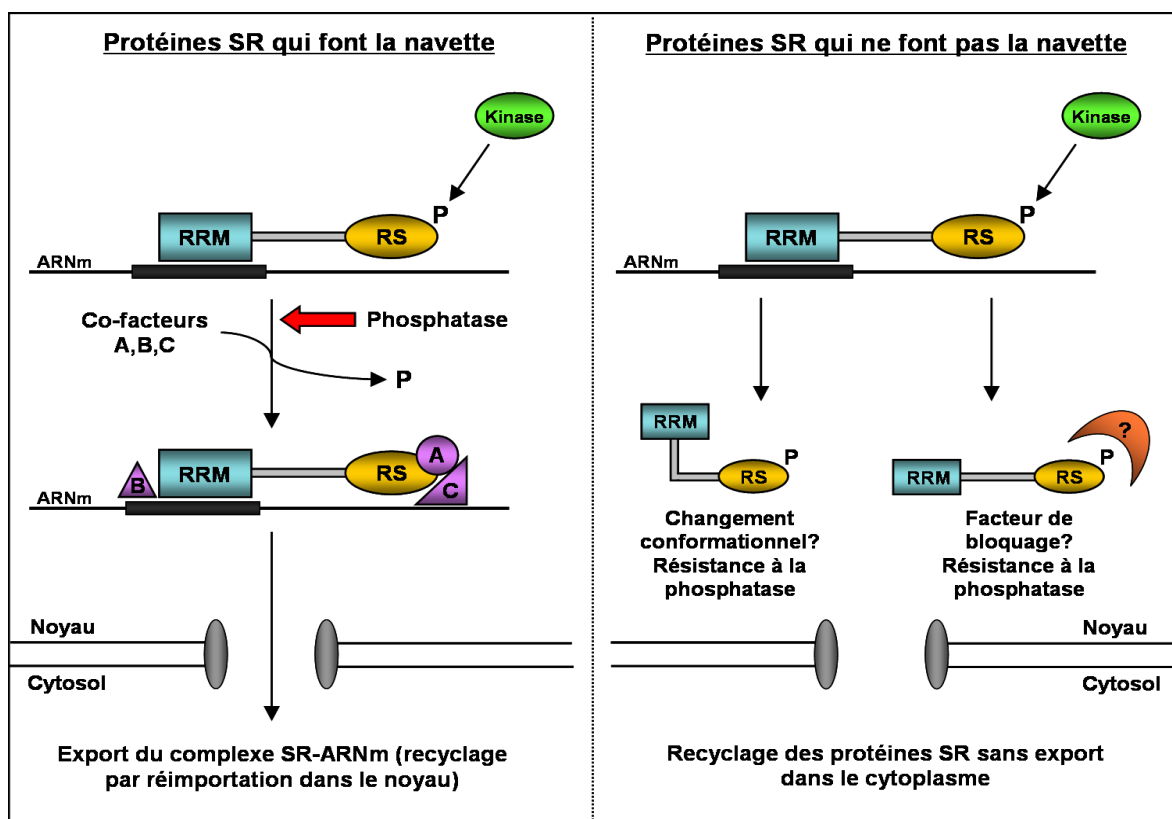


### II.2.4.3 Rôle de la phosphorylation des protéines SR dans la navette noyau-cytoplasme

Certaines protéines SR, comme SF2/ASF, SRp20 et 9G8, sont capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Caceres *et al*, 1998). Ce mouvement nécessite les domaines RS et RRM. Ainsi, le statut de phosphorylation/déphosphorylation conditionne l'interaction des protéines SR avec les systèmes d'export et d'import nucléaires. Par exemple, les protéines SF2/ASF et 9G8 interagissent avec le récepteur d'export nucléaire TAP/NFX1 via des séquences de leur domaine RRM et aussi la déphosphorylation de leur domaine RS (Huang & Steitz, 2001; Huang *et al*, 2003, 2004; Lai & Tarn, 2004). Dans le cytoplasme, la déphosphorylation du domaine RS favorise l'interaction de la protéine SF2/ASF avec l'ARNm épissé et supporte son rôle au cours de la traduction (Sanford *et al*, 2005). Ainsi, les formes hypophosphorylées des protéines SR s'accumulent majoritairement dans le cytosol (Sanford *et al*, 2005). Leur ré-import nucléaire se fait via leur interaction avec le récepteur d'import hMtr10/Transportine-SR et nécessite leur re-phosphorylation par des kinases cytoplasmiques, principalement les kinases SRPK1 et SRPK2 (Lai *et al*, 2001; Ding *et al*, 2006). La phosphorylation des protéines SR dans le cytoplasme pourrait donc agir comme un « switch » entre le dépôt des ARNm dans le cytoplasme et le réimport nucléaire de ces protéines (Gilbert & Guthrie, 2004).

Les protéines qui ne font pas la navette, comme c'est le cas de la protéine SC35, présentent un signal de rétention nucléaire NRS (Nuclear Retention Signal) au niveau de leur domaine RS (Cazalla *et al*, 2002). La phosphorylation de la protéine SC35 induit sa localisation dans les speckles, mais contrairement aux protéines SR "navette" qui subissent une déphosphorylation à l'issue de l'épissage de l'ARNm et sortent associées avec lui dans le cytoplasme où elles sont recyclées, la protéine SC35 reste séquestrée dans le noyau. Des données récentes ont montré que les voies de recyclage des protéines SR qui font la navette et les protéines SR nucléaires sont différentes (Lin *et al*, 2005; Tenenbaum & Aguirre-Ghiso, 2005) (**Figure 15**). Le groupe de Lin a démontré que la protéine SC35 est fortement résistante à la déphosphorylation par les phosphatases. Le domaine NRS de la protéine SC35 est responsable de cette résistance mais les mécanismes par lesquels SC35 et les autres protéines SR qui restent dans le noyau sont recyclées ne sont pas encore bien compris. L'accessibilité du domaine RS de la protéine SC35 pour la phosphorylation par les kinases mais sa résistance à l'action des phosphatases suggèrent que: (i) soit ce domaine subit des changements

conformationnels spécifiques après sa phosphorylation au cours de l'épissage et l'assemblage du spliceosome; (ii) soit il recrute spécifiquement des cofacteurs, qui masquent le domaine RS et bloquent ainsi l'accès des phosphatases (Tenenbaum & Aguirre-Ghiso, 2005) (**Figure 15**). En accord avec ce modèle, le transfert du signal NRS dans la structure de la protéine SF2/ASF induit une résistance de son domaine RS pour l'activité des phosphatases et sa rétention dans le noyau (Lin *et al*, 2005). Les auteurs évoquent aussi la possibilité que la capacité du NRS à séquestrer les protéines SR dans le noyau peut être liée à une hyperphosphorylation de ces protéines à la fin de processus de la maturation de l'ARNm par des kinases nucléaires de la famille "CDC2-like" localisées dans les speckles, dont les membres STY/CLK1 et CLK2-4.



**Figure 15 : Deux voies distinctes de recyclage des protéines SR au cours de l'épissage et la maturation de l'ARNm.**

Les protéines SR phosphorylées se concentrent dans les speckles nucléaires où elles induisent les processus d'épissage du pré-ARNm. A la fin de la maturation de l'ARNm, les protéines SR qui font la navette entre le noyau et le cytoplasme (à gauche) sont déphosphorylées par des phosphatases et les complexes protéines SR-ARNm sont exportés dans le cytoplasme. Les protéines SR sont ensuite recyclées par phosphorylation et réimportation dans le noyau. Par opposition, les protéines SR qui ne sont pas capables de faire la navette (à droite) après phosphorylation par les mêmes ou d'autres kinases restent dans le noyau. Ces protéines sont résistantes à la déphosphorylation, à la suite soit de changements de conformation du domaine RS ou d'une autre partie de la protéine, soit du recrutement d'autres co-facteurs (en orange) qui bloquent l'accès aux phosphatases.

*Adapté d'après Tenenbaum & Aguirre-Ghiso, 2005.*

#### **II.2.4.4 Kinases et phosphatases impliquées dans le contrôle de la phosphorylation réversible des protéines SR**

Plusieurs familles de kinases phosphorylant le domaine RS des protéines SR ont été décrites. Elles sont localisées dans des compartiments cellulaires distincts, et agissent par des mécanismes spécifiques. La recherche de protéines ayant un rôle dans la dissolution des speckles au cours de la mitose (Spector *et al*, 1991) a conduit à l'identification de SRPK1 (Gui *et al*, 1994). SRPK2 a été identifié sur la base de son homologie à SRPK1 (78%) (Wang *et al*, 1998b). Ces kinases sont majoritairement cytoplasmiques mais leur localisation nucléaire a été décrite (Wang *et al*, 1998b), et notamment la relocalisation nucléaire de SRPK1 au cours de la transition G2/M (Ding *et al*, 2006). La phosphorylation des protéines SR, et notamment SF2/ASF, par les kinases SRPKs augmente leur interaction avec d'autres protéines à domaine RS, telles que U1-70, et la surexpression de l'une ou l'autre de ces kinases induit la redistribution des protéines SR des speckles vers le nucléoplasme (Wang *et al*, 1998b). De plus, un rôle des kinases SRPK1 et SRPK2 dans l'assemblage du complexe splicéosomal a été récemment décrit, via leur interaction respective avec la protéine snRNP U1 et le complexe tri-snRNP U4/U6•U5 (Mathew *et al*, 2008). Parallèlement à leur rôle au cours de la formation du splicéosome, les kinases SRPKs jouent un rôle crucial dans l'import nucléaire des protéines SR faisant la navette nucléo-cytoplasmique. Ainsi, le réimport nucléaire de SF2/ASF requiert sa phosphorylation séquentielle et processive par SRPK1 dans le cytoplasme (Hamelberg *et al*, 2007; Hagopian *et al*, 2008; Ngo *et al*, 2008). Dans ce cas, la reconnaissance et la phosphorylation préalable d'un seul résidu sérine situé à l'extrémité C-terminale du domaine RS permettent la phosphorylation séquentielle et directionnelle des autres résidus (Ngo *et al*, 2008). Par la suite, il a été déterminé que le second domaine RRM de SF2/ASF est essentiel au processus d'initiation de la phosphorylation (Ma *et al*, 2009). D'autre part, il a récemment été rapporté une interaction directe entre SRPK1 et les co-chaperonnes HSP40/DNAjc8 et AHA1 dans le cytoplasme, connectant ainsi la kinase aux systèmes moléculaires chaperons contenant HSP70 et HSP90 (Zhong *et al*, 2009). De façon intéressante, l'inhibition de l'activité ATPase de HSP90 ou des conditions de choc osmotique induisent la dissociation de SRPK1 des complexes chaperons et sa translocation dans le noyau, avec pour conséquence des modifications du degré de phosphorylation des protéines SR et des altérations dans la sélection des sites d'épissage (Zhong *et al*, 2009).

La famille des kinases nucléaires CDC2-like ou CLK contient au moins quatre membres, STY/CLK1 et CLK-2, -3, -4, qui interagissent et phosphorylent les protéines SR (Colwill *et al*, 1996) et sont impliquées dans le contrôle de l'épissage (pour revue, Stamm, 2008). Ces kinases possèdent une dualité de spécificité et s'autophosphorylent sur des résidus Tyr aussi bien que sur des résidus Ser/Thr (Lee *et al*, 1996; Nayler *et al*, 1997). Des modifications dans le niveau de phosphorylation de CLK/STY peuvent affecter son activité et sa spécificité (Prasad & Manley, 2003). La phosphorylation des protéines SR par les kinases CLK induit leur relocalisation des speckles vers les zones actives en épissage (Colwill *et al*, 1996; Hartmann *et al*, 2001) et influence leur activité d'épissage (Prasad *et al*, 1999). En contraste avec les données obtenues avec SRPK1, CLK/STY peut phosphoryler l'ensemble du domaine RS de SF2/ASF, conduisant soit à sa libération des speckles nucléaires (Ngo *et al*, 2005), soit à sa rétention dans le cytosol (Caceres *et al*, 1998). Ces données suggèrent que le niveau d'activation des kinases CLK/STY pourrait donc conditionner l'activité des protéines SR et les profils d'épissage (Hartmann *et al*, 2001). Des inhibiteurs pharmacologiques de CLK/STY sont d'ailleurs à l'étude (Muraki *et al*, 2004). Parmi les autres kinases impliquées dans la phosphorylation des protéines SR se trouvent la topoisomérase I (Labourier *et al*, 1998; Soret *et al*, 2003), la glycogène synthase kinase-3 (GSK3) (Hernandez *et al*, 2004) ou la voie PI3Kinase/AKT qui est activée en réponse à la stimulation par les facteurs de croissance et qui phosphoryle les protéines SF2/ASF, SRp40 et 9G8, induisant ainsi des changements dans l'épissage alternatif des pré-ARNm de la protéine kinase C (PKC) ou de la fibronectine (Blaustein *et al*, 2005; Patel *et al*, 2005). De façon intéressante, des études commencent à mettre en évidence des interconnexions entre les différentes kinases pour contrôler la phosphorylation des protéines SR. Ainsi, dans un modèle de mort neuronale, il a été récemment montré qu'AKT phosphoryle SRPK2 sur son résidu Thr492 et stimule sa translocation nucléaire conduisant à la phosphorylation de SC35, à l'accumulation de cycline D1 et à l'apoptose (Jang *et al*, 2009). De la même façon, un effet coopératif des kinases AKT2 et CLK/STY pour le contrôle de l'épissage du pré-ARNm de la PKC $\beta$ , via une modification du statut phosphorylé des protéines SR, a été décrit en réponse à l'insuline (Jiang *et al*, 2009).

Contrairement aux kinases, les données concernant les phosphatases impliquées dans la déphosphorylation des protéines SR sont plus éparpillées. Les protéines PP1, PP2C $\gamma$  et PP2A sont à ce jour les seules phosphatases capables de déphosphoryler les protéines SR. Il a été montré que la déphosphorylation est nécessaire pour la réaction de trans-estérification (Cao *et*

al, 1997; Shi *et al*, 2006). De plus, la modulation de l'activité des phosphatases « *in vitro* » et « *in vivo* » influence le choix des sites d'épissage (Novoyatleva *et al*, 2008). Dans ce contexte, il a été identifié au sein du domaine RRM des protéines SF2/ASF et SRp30c un motif phylogénétiquement conservé (RVXF) de liaison à la protéine PP1 (Misteli & Spector, 1996) qui est nécessaire à la sélection des sites d'épissage « *in vivo* ». Par ailleurs, il a été montré que la phosphatase PP1 fait la navette entre différents compartiments cellulaires (Trinkle-Mulcahy *et al*, 2003), suggérant que cette phosphatase puisse participer à la déphosphorylation des protéines SR à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. Au cours du choc thermique, l'activation de PP1 par dissociation d'avec son inhibiteur NIPP1 induit la déphosphorylation spécifique de SRp38 (Shi & Manley, 2007).

S'il apparaît donc que les cycles de phosphorylation/déphosphorylation des protéines SR conditionnent leur activité et leur localisation subcellulaire, très peu de données existent néanmoins concernant les voies de signalisation qui régissent l'expression et/ou l'activité de ces kinases et/ou phosphatases. De même, les gènes dont l'épissage est spécifiquement modulé en réponse à l'activation de telles ou telles kinases/phosphatases demeurent largement méconnus.

#### **II.2.4.5 Autres modifications post-traductionnelles des protéines SR**

Outre la phosphorylation des résidus sérine au niveau de leur domaine RS, des travaux récents indiquent que les protéines SR sont également soumises à d'autres modifications post-traductionnelles qui moduleraient leurs activités biologiques. Ainsi, une analyse protéomique globale de la méthylation des arginines a identifié 3 sites de méthylation sur SF2/ASF au niveau des résidus 93, 97 et 109 (Ong *et al*, 2004). La méthylation de ces trois arginines conditionne la localisation subcellulaire de SF2/ASF, laquelle en retour détermine les activités de la protéine dans l'activation du NMD et la régulation de l'épissage alternatif d'ARNm endogènes (Sinha *et al*, 2010). Par ailleurs, l'analyse globale de l'acétylation de protéines au niveau de résidus lysines par spectrométrie de masse de haute résolution montre que plusieurs protéines SR pourraient être acétylées, comme par exemples SF2/ASF, SC35 ou encore SRp20 (Choudhary *et al*, 2009). Cependant, le rôle de cette acétylation dans les fonctions exercées par les protéines SR demeure à ce jour inconnu.

#### II.2.4.6 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des protéines SR

A côté des modifications post-traductionnelles, peu de données existent concernant les facteurs régulant le niveau d'expression des protéines SR. Pourtant, l'identification des mécanismes contrôlant leur expression apparaît importante dans la mesure où, comme discuté précédemment, le ratio entre les différents facteurs SR agissant parfois de façon antagoniste va conditionner en aval les profils d'épissage. Il a été récemment montré que la protéine E2 du virus HPV16 transactive le promoteur du gène *sf2/asf* (Mole *et al*, 2009), suggérant que la machinerie virale, pour parfaire son cycle de réplication, contrôle les processus d'épissage cellulaire via la transactivation de facteurs d'épissage. De façon intéressante, un des exemples de régulation des protéines SR les mieux caractérisés est illustré par l'existence commune d'épissage improductif des gènes *SR* (Lareau *et al*, 2007; Ni *et al*, 2007). Ainsi, certaines protéines SR régulent négativement l'épissage de leurs propres transcrits. Par exemple, SRp20 se fixe sur son pré-ARNm, modifie son épissage et conduit à la synthèse d'une protéine présumée inactive, dépourvue de son domaine RS (Jumaa & Nielsen, 1997). De façon inattendue, SF2/ASF antagonise l'effet de SRp20 dans ce contexte (Jumaa & Nielsen, 1997). D'autre part, la surexpression de SC35 dans les cellules HeLa entraîne une diminution significative des niveaux endogènes de son propre ARNm, qui s'accompagne de changements dans l'abondance relative de ses ARNm épissés alternativement. Les variants issus de cet épissage sont pris en charge par la machinerie du NMD, résultant en une diminution globale du niveau d'ARN codant pour SC35 (Sureau *et al*, 2001). De plus, une diminution de l'expression des ARNm codant pour SF2/ASF ou SRp30 a été observée en réponse à leur surexpression (Wang *et al*, 1996; Lopato *et al*, 1999). Ainsi, la capacité des protéines SR à auto-contrôler leur niveau de transcrits apparaît comme un mécanisme commun susceptible d'affecter leur niveau d'expression. Enfin, les protéines SR peuvent réguler leur propre expression de manière plus indirecte. Ainsi, SF2/ASF potentialise la maturation du microARN miR-7, et en retour, le miR-7 mature réprime la traduction de SF2/ASF en ciblant sa région 3'UTR (Wu *et al*, 2010).

#### II.2.5 Fonctions biologiques des protéines SR

En contraste avec la multitude de connaissances disponibles sur les protéines SR d'un point de vue biochimique, peu de données existent concernant leurs fonctions « *in vivo* ». Les expériences d'inactivation de gène ont mis en évidence les rôles fondamentaux des protéines

SR dans la viabilité cellulaire et dans le développement de l'animal. Au niveau physiologique, elles participent à la régulation de la croissance cellulaire, même si dans ce contexte, leurs gènes cibles sont encore mal connus. En outre, leurs rôles dans le contrôle de processus cellulaires tels que l'apoptose ou la réparation de l'ADN commencent seulement à émerger.

#### **II.2.5.1 Rôle des protéines SR dans la viabilité cellulaire et le développement**

Les protéines SR jouent un rôle au cours du développement. Chez la drosophile, la protéine SR B52/SRp55 joue un rôle fondamental dans les étapes du développement (Ring & Lis, 1994; Peng *et al*, 1995) et les protéines SF2/ASF et SC35 participent au développement du système oculaire (Gabut *et al*, 2007). De plus, l'inactivation de SF2/ASF chez *C. elegans* conduit à la mort embryonnaire (Longman *et al*, 2000). Chez la souris, l'inactivation du gène *SRp20* bloque le développement à un stade précoce (Jumaa *et al*, 1999) et l'inactivation de SC35 dans le thymus conduit à un défaut de maturation des cellules T, via la modification de l'épissage du récepteur CD45 (Wang *et al*, 2001). De même, l'ablation tissu-spécifique de SC35 dans le cœur de souris transgéniques conduit à des hypertrophies cardiaques via la diminution de l'expression des récepteurs à canaux calciques cardiaques RyR2 (Ding *et al*, 2004). Enfin, l'inactivation de SF2/ASF durant le développement cardiaque post-natal entraîne une cardiomyopathie causée par la dérégulation d'événements d'épissage touchant les transcrits codant pour la kinase CaMKII $\delta$  (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II $\delta$ ) (Xu *et al*, 2005). Ces données identifient SF2/ASF comme un régulateur d'épissage fondamental du processus de reprogrammation cardiaque. Les protéines SR prises individuellement ne fonctionnent pas de manière équivalente. Par exemple, il a montré dans une lignée cellulaire de poulet que SF2/ASF est un facteur essentiel pour la viabilité cellulaire et que son inactivation n'est pas compensée par l'expression des autres protéines SR, révélant une fonction non-redondante de SF2/ASF dans ce contexte (Wang *et al*, 1996). Il apparaît donc que les protéines SR ne sont pas redondantes entre elles et pourraient agir de façon tissu-dépendante et en alternance aux différents stades de la vie embryonnaire.

#### **II.2.5.2 Rôle des protéines SR au cours du cycle cellulaire**

Les protéines SR ont récemment été impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, et ce dans différentes espèces. En premier lieu, il a été montré une dynamique différentielle d'expression et de localisation subcellulaire de certaines protéines SR au cours des différentes

phases du cycle (Tripathi & Parnaik, 2008). Par exemple, en interphase et en début de mitose, la protéine SC35 se localise sous forme phosphorylée dans les speckles tandis que SF2/ASF s'accumule dans les cellules en interphase (Kruhlak *et al*, 2000; Phair & Misteli, 2000). En outre, SRp20 et SF2/ASF s'associent à la chromatine interphasique et post-mitotique, mais sont dissociées de la chromatine mitotique (Loomis *et al*, 2009). De façon intéressante, ces deux protéines SR se lient à l'extrémité N-terminale des histones, cette fixation étant conditionnée par l'état de phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10P), une marque épigénétique des chromosomes mitotiques. De façon importante, la déplétion de SF2/ASF conduit à la rétention des protéines HP1 au niveau de la chromatine mitotique et entraîne un retard de l'entrée des cellules en G0/G1 du cycle cellulaire. Ainsi, la capacité des protéines SR à s'associer/se dissocier des chromosomes d'une manière dépendante des modifications de l'histone H3 contribuerait à l'arrêt en G2/M du cycle cellulaire et au défaut d'entrée des cellules en G0/G1 (Loomis *et al*, 2009). Les auteurs de cette étude conçoivent donc que les protéines SR présentent une activité de « senseur chromatinien » qui, en collaboration avec HP1, serait nécessaire à la progression du cycle cellulaire.

Par ailleurs, l'accumulation des transcrits codant pour SRp20 a été observée à la fin de la phase G1 et en début de phase S du cycle cellulaire (Jumaa *et al*, 1997). De façon intéressante, des séquences consensus de liaison pour les facteurs de transcription de la famille E2F ont été identifiés sur le promoteur de SRp20, suggérant un rôle de cette protéine SR dans le contrôle du cycle cellulaire par les facteurs de transcription E2Fs. Ces travaux permettent d'envisager que l'expression d'autres protéines SR soit également régulée au cours du cycle et suggèrent un rôle des protéines SR dans le contrôle de l'expression et/ou de l'activité de composants du cycle cellulaire. En accord avec cette hypothèse, il a été montré chez la drosophile que la protéine SR B52 participe au contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire via la régulation de l'épissage alternatif du gène *e2f2* et le contrôle de son expression (Rasheva *et al*, 2006). De plus, la perte d'expression de SC35 dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEF pour Mouse Embryonic Fibroblasts) induit l'arrêt des cellules en G2/M du cycle. Cet effet dépend à la fois de l'hyperphosphorylation de p53 médiée par l'activation d'ATM et de l'hyperacétylation de p53 causée par l'augmentation de l'expression de p300 concomitante à l'épissage aberrant de la déacétylase SIRT1 (Xiao *et al*, 2007). De façon intéressante, les auteurs montrent aussi que la déplétion de SC35 induit l'expression des inhibiteurs des complexes cdk/cycline p21<sup>WAF1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>. Ces données suggèrent que la protéine SC35 contrôle des voies spécifiques régulant la prolifération cellulaire. Une autre



étude a rapporté que la réduction du niveau d'expression de SF2/ASF dans les cellules de poulet (DT40) freine leur croissance cellulaire via un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Li *et al*, 2005). Enfin, l'état de phosphorylation des protéines SR de même que les kinases régulant leur phosphorylation pourrait également jouer des rôles importants dans le contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, la phosphorylation de SC35 par la kinase SRPK2 induit la progression dans le cycle cellulaire de neurones, via l'induction de la cycline D1 (Jang *et al*, 2009). De même, la phosphorylation de la protéine SR acinus par SRPK2 entraîne une augmentation de l'expression de la cycline A1, conduisant à la prolifération cellulaire de cellules leucémiques (Jang *et al*, 2008). Enfin, il a été montré que la phosphorylation de SF2/ASF par la topoisomérase I est requise au cours de la phase de réplication de l'ADN (Tuduri *et al*, 2009).

L'ensemble de ces données indique que les protéines SR ainsi que le niveau de leur phosphorylation régulent la progression du cycle cellulaire, et ce à différentes phases du cycle.

### **II.2.5.3 Rôle des protéines SR dans l'apoptose et la réponse aux dommages de l'ADN**

Il est maintenant bien documenté que l'épissage alternatif régule l'apoptose via la production de variants d'épissage codant pour des protéines aux fonctions distinctes voire même opposées. Par exemple, certaines caspases, telles que les caspases -2, -8 et -9, sont régulées par épissage alternatif donnant lieu à des isoformes pro- et anti-apoptotiques (pour revue, Schwerk & Schulze-Osthoff, 2005). De façon intéressante, il a été décrit un rôle des protéines SR dans le contrôle de l'épissage des caspases. Par exemple, les protéines SC35 et SF2/ASF régulent l'épissage alternatif de la caspase-2 en faveur de l'isoforme longue pro-apoptotique via l'exclusion d'un exon alternatif, tandis que hnRNP A1 favorise l'expression de l'isoforme courte anti-apoptotique (Jiang *et al*, 1998). SF2/ASF est aussi capable de réguler l'épissage de la caspase-9 en réponse aux céramides en faveur de l'isoforme pro-apoptotique (Chalfant *et al*, 2002; Massiello & Chalfant, 2006). En accord avec un rôle des protéines SR au cours des processus apoptotiques, la surexpression de SC35 dans les cellules HeLa induit leur apoptose (Jiang *et al*, 1998) et la neutralisation de SF2/ASF dans les cellules de poulet (DT40) provoque l'arrêt du cycle cellulaire en G2 et l'apoptose (Li *et al*, 2005). Dans ce contexte, l'inactivation de SF2/ASF prévient la fragmentation internucléosomale de l'ADN en régulant l'épissage alternatif du pré-ARNm de ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase) (Li & Manley, 2006). Ainsi, les protéines SR apparaissent comme des

régulateurs positifs ou négatifs de l'apoptose. Là encore, le statut de phosphorylation des protéines SR pourrait jouer un rôle dans le processus apoptotique. En effet, dans les cellules Jurkat, les protéines SR sont déphosphorylées spécifiquement par la phosphatase PP1 en réponse à l'activation du récepteur Fas ou au traitement par les céramides (Chalfant *et al*, 2001). De plus, l'activation des kinases SRPK1 et SRPK2 qui phosphorylent les protéines SR, a été décrite dans les étapes précoces de l'apoptose suivie de leur inactivation dans les phases tardives (Kamachi *et al*, 2002). Enfin, il a été montré que la phosphorylation de SC35 par la kinase SRPK2 provoque la ré-entrée dans le cycle cellulaire de neurones en phase terminale de différenciation, puis leur mort cellulaire par apoptose via l'induction de la cycline D1 (Jang *et al*, 2009).

De part leurs effets sur l'apoptose, les protéines SR pourraient aussi participer à la réponse des cellules aux dommages de l'ADN induits par des stress génotoxiques. Certaines données vont dans ce sens. Ainsi, la protéine SC35 s'accumule dans les fibroblastes BALB/3T3 en réponse aux rayons gamma (Cardoso *et al*, 2002), et la mitomycine C, un agent anticancéreux, augmente l'activité de la topoisomérase I conduisant à la phosphorylation de SF2/ASF et l'accumulation de p53 (Gobert *et al*, 1996). De plus, en réponse à la mitomycine C, le niveau d'expression de certaines protéines SR (SRp55, SRp30 et SRp40) augmente et est corrélé à des modifications du profil d'expression de certains variants d'épissage, tels que CD44 (Filippov *et al*, 2007). Dans ce contexte, la neutralisation de SRp55 dans les cellules traitées augmente leur viabilité, suggérant aussi un rôle de SRp55 dans la réponse au stress génotoxique (Filippov *et al*, 2007).

#### **II.2.5.4 Rôle des protéines SR dans le maintien de la stabilité génomique**

Les protéines SR participent également au maintien de la stabilité du génome. Ainsi, Li et collaborateurs ont montré que l'inactivation de SF2/ASF dans les cellules DT40 conduit à la formation de structures dites en « R-loops » constituées d'un hybride entre l'ARNm nouvellement transcrit et l'ADN, entraînant l'apparition de cassures double brin sur l'ADN à l'origine d'instabilité génétique (Li & Manley, 2005). De même, un autre groupe a mis en évidence que la perte d'expression de SC35 induit une instabilité génomique dans des MEFs (Xiao *et al*, 2007). Des données plus récentes indiquent que la topoisomérase I, une des kinases impliquées dans la phosphorylation des protéines SR, prévient la formation des « R-loops » d'une manière dépendante de SF2/ASF au niveau des fourches de réplication, suggérant que la phosphorylation de SF2/ASF par la topoisomérase I joue un rôle essentiel

dans le maintien de la stabilité génomique (Tuduri *et al*, 2009). L'ensemble de ces résultats indique que les protéines SR auraient un rôle protecteur vis-à-vis de l'intégrité du génome en empêchant l'hybridation des ARNm naissants avec la matrice ADN et donc la formation de structures mutagènes, en accord avec leur rôle de « senseur chromatinien » (Loomis *et al*, 2009).

### II.3. Epissage et cancer

Les dérèglements des processus d'épissage constitutif ou alternatif jouent un rôle majeur dans le développement de maladies variées, et notamment dans la pathologie cancéreuse. Plusieurs études ont rapporté l'existence de profils d'épissage alternatif différentiels entre tissus normaux et cancéreux, et des approches bioinformatiques ont identifié plusieurs centaines de variants d'épissage exprimés spécifiquement dans les cellules cancéreuses (Wang *et al*, 2003; Xu & Lee, 2003; Hui *et al*, 2004; Xi *et al*, 2008). Par exemple, l'étude menée par Xu et Lee a mis en évidence des variants d'épissage spécifiques du cancer dans 316 gènes (Xu & Lee, 2003). Plus récemment, une analyse génomique à grande échelle réalisée dans les cancers du poumon a identifié 13 % des 17800 gènes examinés comme possédant des transcrits alternatifs différemment exprimés entre adénocarcinome pulmonaires et tissus normaux (Xi *et al*, 2008). Les transcrits aberrants retrouvés dans les cellules cancéreuses sont pour la plupart pris en charge par les systèmes de surveillance cellulaires tel que le NMD et dégradés avant leur expression protéique. Cependant, certains ARNm aberrants échappent à ces systèmes et sont capables de produire des isoformes protéiques aux propriétés potentiellement oncogéniques. L'ensemble de ces données révèle donc l'existence d'un lien étroit entre épissage et cancer. A ce jour, il reste à déterminer si les variants d'épissage spécifiques du cancer apparaissent seulement après la transformation cellulaire ou s'ils sont l'un des éléments contribuant au processus de tumorigenèse, de même qu'il reste à caractériser plus en détail les mécanismes moléculaires impliqués dans cette dérégulation. De façon importante, les anomalies touchant l'épissage décrites dans les cancers affectent des gènes associés à la prolifération cellulaire (oncogènes), l'apoptose (gènes suppresseurs de tumeurs), l'invasion cellulaire, l'angiogenèse et/ou la différenciation (Venables, 2006). Sur le plan mécanistique, deux grandes catégories d'anomalies affectant l'épissage ont été répertoriées (Faustino & Cooper, 2003). La première catégorie comprend les anomalies dites en "cis" qui affectent les sites d'épissage ou les

éléments régulateurs (ESE). La seconde catégorie concerne l'altération de l'activité des protéines agissant en "*trans*", c'est-à-dire les anomalies de la machinerie d'épissage.

### II.3.1 Anomalies en "*cis*"

Les anomalies dites en "*cis*", qu'elles soient héritées (cellules germinales) ou acquises (cellules somatiques) modifient l'utilisation des sites d'épissage constitutif ou alternatif au sein du pré-ARNm. Elles résultent majoritairement de mutations ponctuelles à l'intérieur des séquences canoniques d'épissage au niveau des introns ou des exons. Ainsi, elles peuvent éliminer ou créer des sites d'épissage, modifier des séquences consensus ou affecter les éléments régulateurs tels que les séquences ESE. Dans la majorité des cas, l'utilisation de sites d'épissage inhabituels ou la rétention d'intron introduit un codon stop prématuré sur l'ARNm, résultant en sa dégradation par le NMD et en la perte fonction de l'allèle muté (Faustino & Cooper, 2003). Un certain nombre de ces mutations qui affaiblissent des sites d'épissage ou en créent de nouveaux a été identifié dans différents gènes associés au cancer (Srebrow & Kornblihtt, 2006) (**Table 2**).

Gène (Fonction)	Pathologie	Séquence mutée	Conséquences moléculaires
<b>LKB1</b> (suppresseur de tumeur)	Syndrome de Peutz-Jeghers (augmentation du risque cancéreux)	IVS2+1A>G (mutation dans le site d'épissage 5' de l'intron 2)	Destruction du spliceosome mineur; site d'épissage 5' muté encore utilisé, avec des sites d'épissage 3' cryptiques non canonique; niveau protéique faible
<b>KIT</b> (oncogène)	Tumeur stromale gastrointestinale	Délétion de 30 ou 40 nucléotides comprenant le site d'épissage 3' IVS10	Epissage aberrant; activation constitutive de la protéine
<b>CDH17</b> (LI-cadhérine)	Carcinome hépatocellulaire	IVS6+35A>G	Génération d'une séquence ISS (?); exclusion de l'exon 7
<b>CDH17</b> (LI-cadhérine)	Carcinome hépatocellulaire	Mutation codon 651 exon 6	Génération d'une séquence ESS (?); exclusion de l'exon 7
<b>KLF6</b> (suppresseur de tumeur)	Cancer de la prostate	IVS1-27G>A (allèle <i>IVS ΔA</i> )	Génération d'un site de fixation (ISE) pour SRp40; nouveaux variants d'épissage agissant comme des dominants négatifs
<b>HAS1</b> (hyaluronan synthase)	Myélomes multiples	E3 C7760T	Exclusion de l'exon 4
<b>BRCA1</b> (suppresseur de tumeur)	Cancer du sein et de l'ovaire	E18 G5199T (mutation ponctuelle dans l'exon 18)	Destruction d'une séquence ESE; exclusion de l'exon 18

**Table 2 : Exemples de mutations dans des séquences d'épissage agissant en "*cis*" associées à des pathologies malignes.**

*Adapté d'après Srebrow & Kornblihtt, 2006.*

Par exemple, une mutation héritée nonsense dans l'exon 18 du gène de susceptibilité au cancer du sein *BRCA1* perturbe un site de fixation de la protéine SF2/ASF, provoquant l'exclusion inappropriée de cet exon et la modification d'un domaine protéique (Liu *et al*, 2001). Néanmoins, peu de mutations affectant les sites d'épissage ont été décrites parmi les gènes dont les patrons d'épissage sont anormaux dans les cancers, suggérant que ces changements pourraient être liés à des anomalies des facteurs protéiques agissant en "trans" (Kim *et al*, 2008).

### II.3.2 Anomalies affectant les protéines régulant l'épissage

Les changements dans la concentration, la localisation, la composition ou l'activité des facteurs régulateurs de l'épissage agissant en "trans" (protéines hnRNP et SR) peuvent aussi affecter les processus d'épissage. De plus en plus d'évidences suggèrent une connexion étroite entre la dérégulation de l'expression des protéines SR et hnRNP et le développement tumoral, via une modification des patrons d'épissage de gènes clés (**Table 3**). Par exemple, des modifications des concentrations relatives des protéines SR ont été retrouvées au cours de la progression du cancer mammaire chez la souris, et sont associées à des changements dans l'épissage de CD44, une glycoprotéine membranaire impliquée dans les processus de migration et d'adhésion cellulaires (Stickeler *et al*, 1999). De tels changements ont également été mis en évidence dans des tumeurs pulmonaires chez la souris (Zerbe *et al*, 2004) et dans des carcinomes du colon chez l'homme (Ghigna *et al*, 1998), en corrélation avec une modification de la balance hnRNP A1-SF2/ASF. L'augmentation d'expression des protéines SR est généralement corrélée à la progression tumorale, comme en témoigne l'expression élevée de SF2/ASF, SC35 et SRp20 retrouvée dans les tissus ovariens malins (Fischer *et al*, 2004) et de plusieurs protéines SR dans les cancers du sein (Stickeler *et al*, 1999). Cependant, les niveaux des transcrits de SF2/ASF, SRp40, SRp55 et SRp75 sont plus bas dans les adénocarcinomes colorectaux non familiaux que dans les tissus sains adjacents, suggérant que les niveaux des protéines SR dans les tissus cancéreux pourraient être tissu-spécifiques (Ghigna *et al*, 1998). L'expression de SF2/ASF est augmentée dans de nombreuses tumeurs humaines, incluant les cancers du poumon, du colon, du rein, du foie, du pancréas et du sein, par amplification génique ou surexpression de la protéine, ce qui affecte l'épissage alternatif de gènes suppresseurs de tumeurs (Bridging Integrator 1 ou BIN1) et d'oncogènes (kinases MNK2 et S6K1) (Karni *et al*, 2007). Dans cette étude, les auteurs démontrent pour la première fois que la dérégulation d'un facteur d'épissage, en l'occurrence SF2/ASF, peut

conduire à la transformation de fibroblastes immortalisés murins. SF2/ASF est aussi capable de réguler l'épissage alternatif du proto-oncogène Ron conduisant à l'accumulation d'une isoforme constitutivement active  $\Delta$ Ron, qui augmente la mobilité cellulaire impliquée dans le processus de métastases (Ghigna *et al*, 2005). Ces études identifient donc SF2/ASF comme un proto-oncogène (Karni *et al*, 2007). De plus, les relations existant entre SF2/ASF et certaines voies de signalisation cellulaire telles que l'initiation de la traduction avec 4E-BP1 (Michlewski *et al*, 2008) ou la synthèse protéique avec mTORC1 (Karni *et al*, 2008), pourraient largement accroître son potentiel oncogénique. Ces travaux suggèrent aussi que d'autres facteurs d'épissage anormalement exprimés dans les cellules cancéreuses pourraient avoir des propriétés oncogéniques dans certains types cellulaires ou dans des contextes génétiques spécifiques. Ainsi, SC35 régule l'épissage du suppresseur de tumeur KLF6 en réponse à la caféine (Shi *et al*, 2008).

Bien que très peu documentées, des modifications post-traductionnelles, telles qu'une phosphorylation anormale des protéines SR, ou des modifications de la localisation subcellulaire de ces protéines pourraient aussi contribuer au processus de carcinogénèse. Cette hypothèse est supportée par l'observation de l'hyperphosphorylation de plusieurs protéines SR dans les tumeurs humaines, notamment dans les cancers ovariens (Fischer *et al*, 2004). De plus, la kinase SRPK1 qui phosphoryle les protéines SR est surexprimée dans les cancers du sein, du colon, du pancréas et des testicules (Hayes *et al*, 2007). Enfin, l'expression anormale des facteurs d'épissage dans les cellules tumorales pourrait également être impliquée dans la résistance des cellules aux drogues couramment utilisées en thérapie anticancéreuse. Par exemple, l'augmentation d'expression des facteurs d'épissage SRp20 et PTB (Polypyrimidine Tract-binding Protein) dans les cancers ovariens corrèle avec la production d'isoformes d'épissage alternatif de MRP1, lequel confère une résistance accrue à la doxorubicine (He *et al*, 2004). SRPK1 est un facteur de résistance à l'apoptose induite par la gemcitabine et le cisplatine (Sanz *et al*, 2002; Schenk *et al*, 2004).

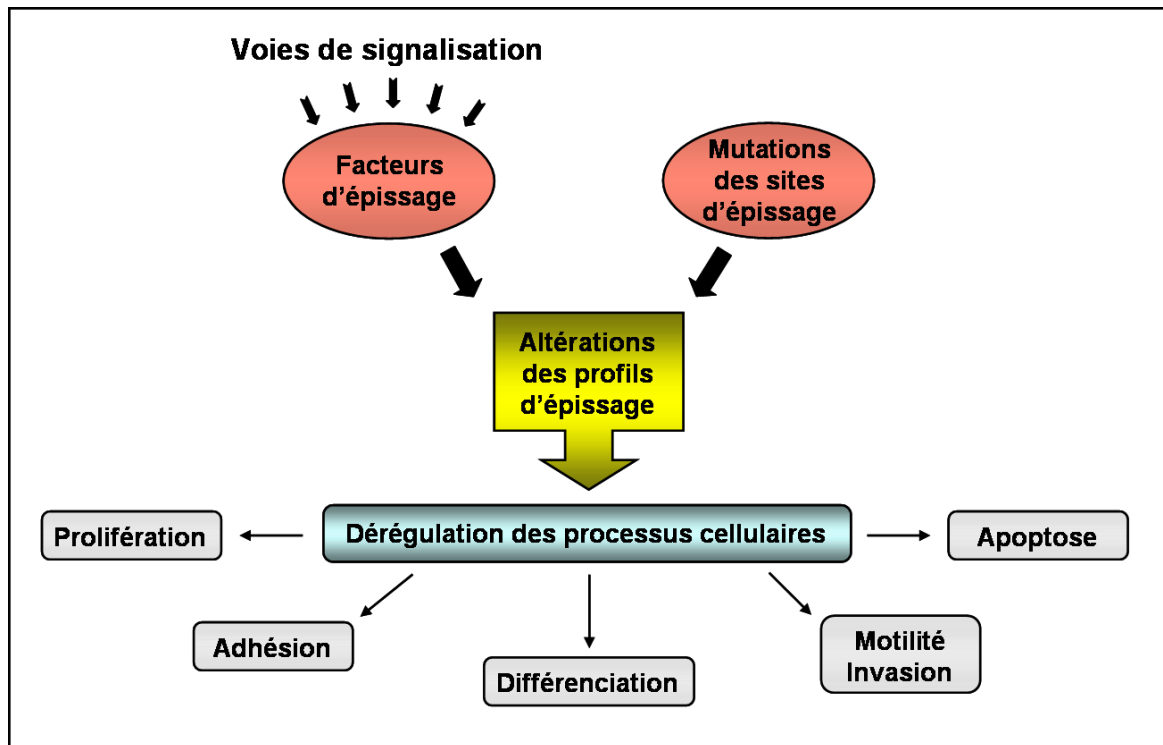
	Nom (noms alternatifs)	Tissu(s) cancéreux	ARNm affecté(s)
<b>Facteurs protéiques régulant l'épissage dont l'expression est augmentée dans les cancers</b>			
<b>Protéines SR et SR-like</b>	SF2/ASF (SFRS1)	Colon, thyroïde, petit intestin, rein, poulmon et sein	RON, BIN1, S6K1, MNK2
	SC35 (SFRS2)	Ovaire, poulmon, sein	-
	SRp20 (SFRS3)	Ovaire	MRP1
	SRp40 (SFRS5)	Sein	CD44
	SRp55 (SFRS6)	Sein	-
	TRA2-β1 (SFRS10)	Sein	CD44
	SRm160 (SRRM1)	Epithélium thymique, estomac et rein	CD44
<b>Protéines hnRNP</b>	hnRNP A1 (HNRNPA1)	Poulmon, sein et ovaire	-
	hnRNP B1 (HNRNPA2B1)	Poulmon	-
	hnRNP F (HNRNPF)	Colon	-
	hnRNP L (HNRNPL)	Lignées cellulaires dérivées du cancer de l'oesophage	-
	hnRNP K (HNRNPK)	Colorectal et oral	-
	PTB (PTBP1, HNRNPI)	Glioblastome et ovaire	FGFR1, MRP1
<b>Autres facteurs</b>	YB-1 (YBX1)	Ovaire	CD44
	SPF45 (RBM17)	Vessie, sein, colon, poulmon, ovaire, pancréas et prostate	FAS
	SRPK1 (SFRSK1)	Pancréas, sein, colon, leucémie à cellules T et leucémie myéloïde chronique	MAP2K2
	HuR (ELAVL1)	Sein et ovaire	FAS
	HuD (ELAVL4)	Leucémie aiguë lymphoblastique à cellules T	IK
	Sam68 (KHDRBS1)	Prostate	-
<b>Facteurs protéiques régulant l'épissage dont l'expression est diminuée dans les cancers</b>			
<b>Protéines hnRNP</b>	hnRNP E2 (PCBP2)	Oral	-
<b>Autres facteurs</b>	U2AF35 (U2AF1)	Pancréas	CCK-B
	SF1 (Sfl)	Colorectal	WISP1, FGFR3
	RBM5 (LUCA15)	Poulmon	-

Table 3 : Facteurs d'épissage altérés dans les cancers et cibles potentielles.

Adapté d'après Grosso et al, 2008.

En conclusion, des mutations affectant le choix des sites d'épissage, l'assemblage du splicéosome ou les facteurs régulant l'épissage pourraient participer au développement des cancers, via la modification de processus cellulaires cruciaux comme la prolifération cellulaire, l'apoptose ou l'invasion (**Figure 16**). Il reste maintenant à déterminer: (i) quelles sont les voies de signalisation impliquées dans ces effets; (ii) quels facteurs protéiques

contrôlent l'expression des facteurs d'épissage dans les cancers; (iii) quels sont les facteurs d'épissage dérégulés dans les cancers et leurs gènes cibles dans ce contexte.



**Figure 16 : Causes et possibles conséquences fonctionnelles des anomalies affectant l'épissage des pré-ARNm.**

Des mutations touchant des séquences agissant en "cis" ainsi que des modifications de l'expression et/ou de l'activité des facteurs régulant l'épissage ou encore de la balance entre ces facteurs modifient les patrons d'épissage de gènes spécifiques et conduisent à la dérégulation de processus cellulaires cruciaux tels que la prolifération ou l'invasion cellulaire à l'origine du cancer.

*D'après Srebrow & Kornblihtt, 2006.*



## III. L'ACÉTYLATION DES PROTÉINES NON-HISTONES

### III.1. Aspects généraux de l'acétylation

#### III.1.1 Définition

L'acétylation est une modification post-traductionnelle réversible des protéines largement répandue chez les eucaryotes. L'état d'acétylation des protéines est contrôlé par deux familles d'enzymes aux activités opposées mais en équilibre permanent : les histones acétyltransférases (HATs) et les histones déacétylases (HDACs) qui ajoutent et enlèvent, respectivement, un groupement acétyle sur des résidus lysines spécifiques.

L'acétylation des lysines a été initialement découverte comme une modification épigénétique des histones, d'où le nom couramment employé pour les enzymes catalysant cette réaction. Il a été proposé que l'acétylation des histones altère les interactions histone-ADN pour créer une architecture chromatinienne plus permissive à la transcription (pour revue, Shahbazian & Grunstein, 2007). A ce titre, cette modification est presque invariablement associée à l'activation de la transcription. A l'inverse, la déacétylation corrèle avec une répression de la transcription. Des investigations plus récentes ont mis en évidence que l'acétylation des lysines pouvait également avoir lieu sur des protéines non-histones. Ainsi, les études de protéomique ont identifié un nombre toujours plus important de substrats non-histones soumis à acétylation, notamment des facteurs de transcription et des co-régulateurs transcriptionnels (Iwabata *et al*, 2005; Kim *et al*, 2006a) (**Table 4**). Dernièrement, une analyse par spectrométrie de masse à grande échelle a identifié 3600 sites d'acétylation sur 1750 protéines (Choudhary *et al*, 2009). De façon importante, cette étude révèle que l'acétylation des lysines cible préférentiellement de larges complexes macromoléculaires impliqués dans divers processus cellulaires, tels que le remodelage de la chromatine, le cycle cellulaire, l'épissage des ARNm, le transport nucléaire, le métabolisme énergétique et le remodelage du cytosquelette d'actine (**Table 4**). De façon très intéressante, les domaines structuraux les plus enclins à acétylation sont les motifs de reconnaissance de l'ARN ou domaines RRM, retrouvés entre autres au sein des protéines SR (Choudhary *et al*, 2009).

Fonction	Protéines
Facteurs de transcription	p53, p73, c-Myc, c-Jun, AML1, BCL-6, E2F1, E2F2, E2F3, GATA-1, GATA-2, GATA-3, GATA-4, Ying Yang 1 (YY1), NF- $\kappa$ B (RelA/p65), MEF2, CREB, HIF-1 $\alpha$ , BETA-2, POP-1, IRF-2, IRF-7, SRY, EKLF, TCF, NF-Y, STAT3, MyoD
Récepteurs aux stéroïdes	Récepteur des androgènes, récepteur $\alpha$ des oestrogènes, récepteur des glucocorticoïdes
Co-régulateurs transcriptionnels	RB, DEK, MSL-3, HMGI(Y)/HMGA1, CtBP2, PGC-1 $\alpha$
Médiateurs de signalisation	Smad7, $\beta$ -caténine, IRS-1, cdk9
Enzymes de réparation de l'ADN	Ku70, WRN, TDG, NEIL2, FEN1
Enzymes du métabolisme	Acétyl-CoA synthétase, pyruvate kinase
Facteurs de l'import nucléaire	Importine- $\alpha$ , Rch1
Protéines de structure	Tubuline- $\alpha$ , actine, cortactine
Protéines chaperomes	HSP90, HSP70
Médiateurs de l'inflammation	HMGB1
Protéines virales	E1A, L-HDAg, S-HDAg, antigène T SV40, Tat HIV

**Table 4 : Exemples de protéines non-histones substrats d'acétylation.**

*Adapté d'après Di Gennaro et al, 2004; Glozak et al, 2005; Xu et al, 2007; Yang & Seto, 2007.*

L'ensemble de ces travaux souligne donc le rôle fondamental de l'acétylation dans le contrôle de fonctions cellulaires essentielles. Ainsi, les HATs et les HDACs peuvent être considérées comme des facteurs multifonctionnels, agissant non seulement sur la transcription, mais aussi sur une variété d'autres processus cellulaires. La suite de ce chapitre sera essentiellement consacrée à l'acétylation des protéines non-histones.

### III.1.2 Acteurs moléculaires de l'acétylation/déacétylation

#### III.1.2.1 Les histones acétyltransférases (HATs)

Les histones acétyltransférases sont généralement des protéines de haut poids moléculaire et des co-activateurs transcriptionnels agissant dans le noyau ou dans le cytoplasme de la cellule. La quasi-totalité de ces enzymes fonctionne comme sous-unité catalytique au sein de complexes multi-protéiques. Chez l'homme, une trentaine de protéines possédant une activité histone acétyltransférase a été identifiée. Ces protéines peuvent être subdivisées en trois groupes majeurs sur la base de motifs structuraux hautement conservés. On retrouve la famille **GNAT** (GCN5 related N-AcetylTransferase) qui contient l'enzyme P/CAF (p300/CBP Associated Factor) (Yang *et al*, 1996), la famille **p300/CBP** (p300/CREB

Binding Protein) (Ogryzko *et al*, 1996), et la famille **MYST**, qui inclue les protéines humaines MOZ (MONocytic leukaemia Zinc finger protein), MORF (MONocytic leukemia zinc finger Related Factor) et Tip60 (Tat Interacting Protein 60 kDa) (Borrow *et al*, 1996; Kamine *et al*, 1996; Champagne *et al*, 1999). Chacune de ces HATs possède une spécificité de substrats particulière et différentes HATs sont susceptibles d'acétyler un résidu lysine donné.

### III.1.2.2 Les différentes classes d'histones déacétylases

Les histones déacétylases font partie de la superfamille des métalloenzymes à zinc et ont été classées, à la suite d'analyses phylogénétiques, selon leur homologie de séquence avec les HDACs de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, leur poids moléculaire et leur localisation intracellulaire (de Ruijter *et al*, 2003). A ce jour, 18 HDACs humaines ont été identifiées. Elles se répartissent en trois grandes classes distinctes :

- Les HDACs de **classe I** : il s'agit des HDACs 1, 2, 3 et 8. Ces HDACs sont des homologues du répresseur transcriptionnel de levures yRPD3 (yeast Reduced Potassium Dependency 3). Ces enzymes présentent une structure compacte. Elles sont exprimées dans la plupart des tissus et lignées cellulaires, et sont présentes majoritairement dans le noyau.
- Les HDACs de **classe II** : il s'agit des HDACs 4, 5, 6, 7, 9 et 10 (pour revue, Verdin *et al*, 2003). Ce sont des homologues de yHDA1 (yeast Histone Deacetylase-A1). Elles sont tissu-spécifiques et peuvent faire la navette nucléo-cytoplasmique en réponse à divers signaux cellulaires. Elles peuvent être subdivisées en deux sous-classes, HDACs IIa (HDACs 4, 5, 7 et 9) et HDACs IIb (HDACs 6 et 10), basées sur leur homologie de séquence et l'organisation de leurs domaines. Les HDACs IIb se caractérisent par la duplication de leurs domaines HDACs, même si celle-ci n'est que partielle dans le cas de HDAC10.
- Les HDACs de **classe III** ou **sirtuines** : elles ne montrent aucune homologie avec les HDACs de classe I et II. Ce sont des HDACs similaires à ySIR2 (yeast Silent Information Regulator 2) dont l'activité enzymatique dépend du NAD<sup>+</sup>. On y retrouve SIRT 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7. Cette classe de HDACs est la moins bien caractérisée (pour revue, Saunders *et al*, 2007).

La dernière déacétylase connue est HDAC11. Celle-ci possède des homologies à la fois avec les HDACs de classe I et celles de classe II. Pour cette raison, elle n'est répertoriée dans aucune des différentes classes.

Les HDACs présentent un domaine catalytique hautement conservé d'environ 390 acides aminés. De manière similaire aux HATs, elles existent dans de larges complexes à l'intérieur des cellules. Elles possèdent des spécificités de substrats et la plupart d'entre elles peuvent, tout du moins « *in vitro* », déacétyler des protéines non-histones.

## III.2. Exemples d'enzymes à activité acétyltransférase et à activité déacétylase

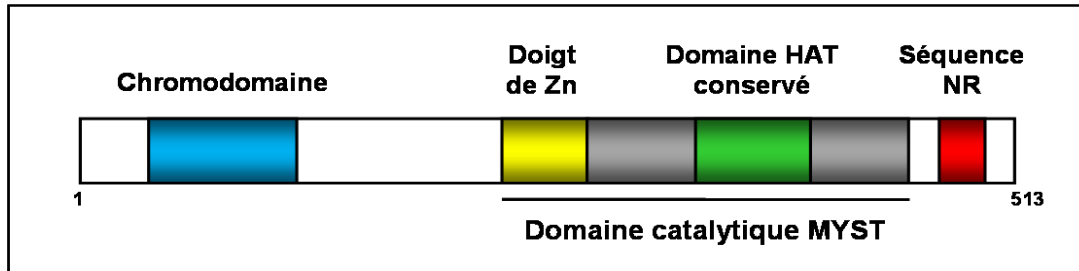
### III.2.1 L'acétyltransférase Tip60 : une protéine clé de la réponse aux dommages de l'ADN

#### III.2.1.1 Structure et caractéristiques générales de Tip60

La protéine Tip60 a originellement été identifiée comme une acétyltransférase cellulaire interagissant avec la protéine Tat du virus HIV-1 (Kamine *et al*, 1996). D'un point de vue structural, Tip60 est constituée en position N-terminale d'un chromodomaine et en C-terminal d'un domaine MYST très conservé (**Figure 17**). Le domaine MYST est le domaine catalytique. Il contient une petite séquence (résidus 335-404, « domaine HAT conservé ») qui lie l'acétyl-co-enzyme A et le substrat et qui est conservée au sein des autres familles d'histones acétyltransférases. Le domaine MYST possède également un motif en doigt de zinc Cys-Cys-His-Cys, qui est essentiel à l'activité acétyltransférase de Tip60 et pour ses interactions protéine-protéine (Xiao *et al*, 2003). A son extrémité C-terminale, Tip60 renferme un domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires (Gaughan *et al*, 2001). Tip60 est une protéine ubiquitaire, instable, de demi-vie courte (30 à 190 minutes) selon le type cellulaire étudié (Legube *et al*, 2002; Eymin *et al*, 2006). En l'absence de stimuli, un faible niveau d'expression de Tip60 est maintenu dans la cellule via l'activation du protéasome.

Outre sa capacité à acétyler les histones de cœur, Tip60 peut également acétyler des protéines non-histones telles que les facteurs de transcription p53 (Tang *et al*, 2006) et c-Myc (Patel *et al*, 2004), le récepteur aux androgènes (AR) (Gaughan *et al*, 2002), la kinase ATM (Sun *et al*, 2005) ou encore le suppresseur de tumeur RB (Leduc *et al*, 2006). Les études « *in vitro* » suggèrent qu'il n'existerait pas de motif consensus apparent pour la fixation de Tip60 à ses substrats. La protéine Tip60 existe au sein d'un complexe multi-protéique nucléaire stable

constitué d'au moins 18 sous unités telles que la protéine TRRAP (TRansformation/tRanscription domain-Associated Protein), l'ATPase p400/Domino, la protéine inhibitrice de croissance ING3 et le facteur BAF53 (53 kDa BRG-1/human BRM-associated factor). Ce complexe réalise la plupart des fonctions transcriptionnelles et de réponse aux dommages de l'ADN de Tip60.



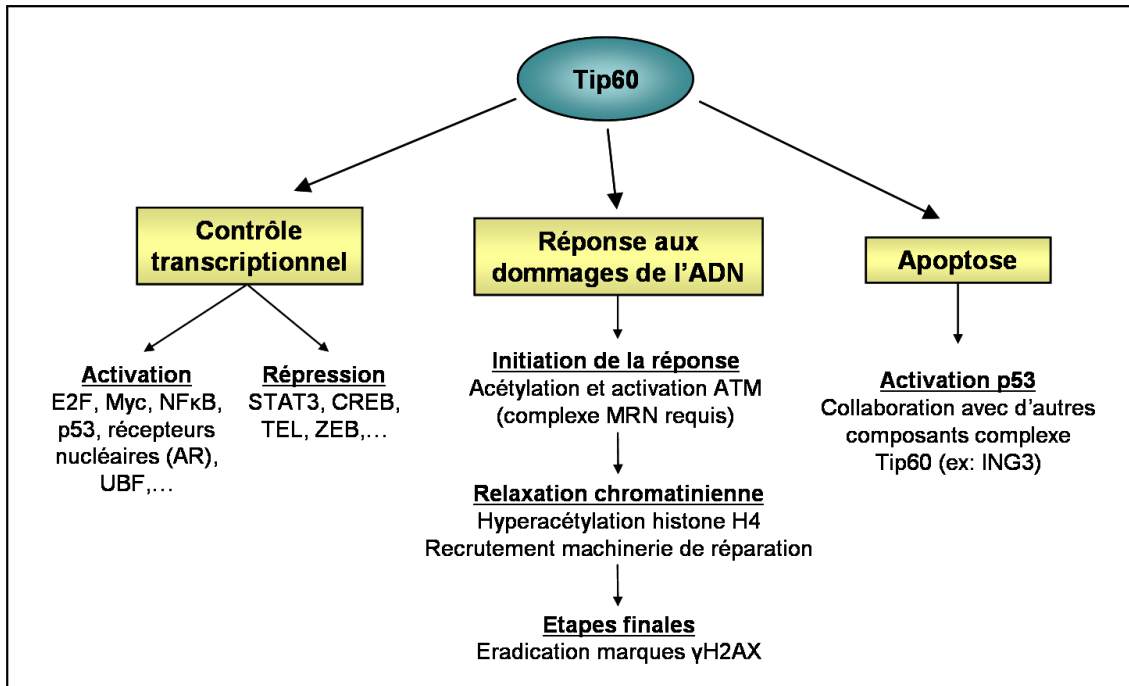
**Figure 17 : Représentation schématique des différents domaines de l'histone acétyltransférase Tip60.**

La protéine Tip60 contient dans sa partie N-terminale un chromodomaine qui lui confère la capacité d'interagir avec les lysines méthylées des histones. Tip60 possède un domaine catalytique MYST dans sa région C-terminale qui est constitué d'une courte séquence correspondant au domaine HAT conservé qui fixe l'acétyl-CoA et le substrat, ainsi que d'un motif en doigt de zinc essentiel à son activité acétyltransférase et requis pour les interactions protéine-protéine. A son extrémité C-terminale est retrouvée une séquence d'interaction avec les récepteurs nucléaires (NR).

*D'après Sapountzi et al, 2006.*

### III.2.1.2 Fonctions biologiques de Tip60

La protéine Tip60 est connue pour être recrutée par un nombre varié de facteurs de transcription au niveau de leurs promoteurs cibles où elle participe à l'acétylation des histones et à l'activation transcriptionnelle (**Figure 18**). Ainsi, Tip60 est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation telles que la voie de signalisation de c-Myc, du récepteur aux androgènes et de NF $\kappa$ B. Tip60 est aussi engagé dans le programme transcriptionnel de E2F1. En effet, le complexe Tip60 est recruté sur les promoteurs des gènes cibles de E2F1 où il est responsable de l'acétylation de l'histone H4. Ces gènes cibles incluent les gènes codant pour p107 (pocket protein p107), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), MCM3 et MCM4 (Minichromosome maintenance 3/4) (Taubert *et al*, 2004). Parallèlement à l'acétylation des histones au niveau de ces promoteurs, Tip60 est aussi capable d'acétyler directement c-Myc et de le stabiliser (Patel *et al*, 2004). A l'inverse, même si Tip60 est généralement considéré comme un co-activateur de la transcription des gènes, il existe des cas où sa présence réprime l'expression de gènes cibles. Notamment, Tip60 réprime l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription STAT3 via le recrutement de HDAC7 (Xiao *et al*, 2003).



**Figure 18 : Fonctions biologiques de l'acétyltransférase Tip60.**

Outre son implication dans le contrôle transcriptionnel, la protéine Tip60 participe activement à la réponse aux dommages de l'ADN et peut initier l'apoptose dépendante de p53 lorsque les lésions de l'ADN sont trop importantes pour être corrigées.

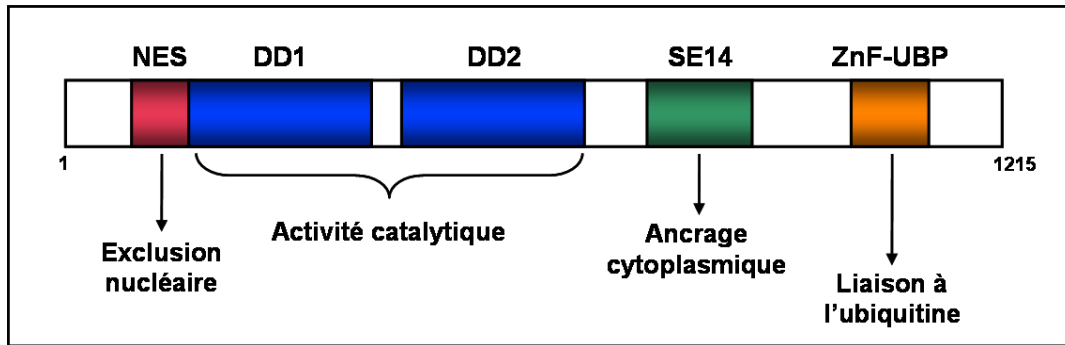
Tip60 est impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN, et ce à différents niveaux (**Figure 18**). Il participe à l'initiation de la réponse aux lésions sur l'ADN en réponse au stress génotoxique. Ainsi, des travaux ont montré que Tip60 active la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) en l'acétylant ce qui conduit ensuite à l'activation de toute la cascade de phosphorylations nécessaire à la réparation des lésions de l'ADN (Sun *et al*, 2005). Plus récemment, la même équipe a montré que le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1), un senseur des cassures double brin, recrute Tip60 via son chromodomaine au niveau de la lysine 9 triméthylée de l'histone H3 et stimule son activité acétyltransférase envers ATM (Sun *et al*, 2009, 2010), faisant de Tip60 un acteur très précoce de la réponse aux dommages de l'ADN. D'autre part, Tip60 permet la relaxation de la chromatine, via notamment l'hyperacétylation de l'histone H4 au niveau des cassures (Murr *et al*, 2006). Cette ouverture de la chromatine faciliterait l'accès à la machinerie de réparation (Tamburini & Tyler, 2005). D'ailleurs, Tip60 est capable de recruter directement des acteurs du processus de réparation, tels que les sous-unités RRM1 et RRM2 de la ribonucléase réductase (Niida *et al*, 2010). Enfin, Tip60 participerait aux étapes finales de la réparation de ces lésions en permettant l'éradication des marques  $\gamma$ H2AX après achèvement du processus de réparation (Kusch *et al*, 2004). L'activité acétyltransférase de Tip60 est également requise dans le déclenchement de l'apoptose

dépendante de p53 lorsque les lésions de l'ADN sont trop importantes pour être réparées (**Figure 18**). Dans ce contexte, il a été montré que l'acétylation de p53 par Tip60 module la décision entre arrêt du cycle cellulaire et apoptose (Tang *et al*, 2006).

### III.2.2 HDAC6 : une déacétylase cytoplasmique singulière

#### III.2.2.1 Description générale de HDAC6

Découverte en 1999 (Verdel & Khochbin, 1999), l'histone déacétylase HDAC6 est une enzyme unique qui possède des caractéristiques structurales et fonctionnelles bien spécifiques. En effet, à la différence des membres des classes I et IIa des HDACs, HDAC6 possède, dans sa région N-terminale, deux domaines déacétylases (**Figure 19**) qui sont conservés au cours de l'évolution. L'analyse initiale de l'activité catalytique de ces deux domaines HDACs suggérait qu'ils pouvaient fonctionner indépendamment l'un de l'autre (Grozinger *et al*, 1999). Néanmoins, des études plus approfondies de l'influence interne des deux domaines dans le processus de déacétylation ont remis en question ce résultat, en montrant que l'activité catalytique de HDAC6 reposait soit sur la présence simultanée des deux domaines (Zhang *et al*, 2006), soit uniquement sur la présence du second domaine catalytique (Zou *et al*, 2006). Un autre aspect remarquable de HDAC6 est la présence, en son extrémité C-terminale, d'un motif en doigt de zinc conservé, appelé domaine ZnF-UBP (Seigneurin-Berny *et al*, 2001) (**Figure 19**). Ce domaine a la particularité de fixer spécifiquement les chaînes mono- et poly-ubiquitinylées (Seigneurin-Berny *et al*, 2001; Hook *et al*, 2002; Boyault *et al*, 2006). Chez la souris, HDAC6 est activement maintenue dans le cytoplasme et peut, sous certaines conditions, être partiellement délocalisée dans le noyau (Verdel *et al*, 2000). En effet, un fort signal d'export nucléaire (NES) localisé dans le premier domaine catalytique prévient l'accumulation de la protéine dans le noyau. De façon intéressante, bien que cette séquence NES soit conservée dans la protéine HDAC6 humaine, une autre région de la protéine située entre le second domaine déacétylase et le domaine C-terminal ZnF-UBP, assure un ancrage stable de la protéine dans le cytoplasme. Ce domaine, nommé SE14, n'est pas conservé dans les autres espèces et se caractérise par la succession de 8 répétitions d'un tétradécapeptide contenant des enchaînements Ser-Glu (Bertos *et al*, 2004) (**Figure 19**).



**Figure 19 : Organisation structurale de la déacétylase HDAC6 humaine.**

La protéine HDAC6 est le seul membre de la famille des histones déacétylases à posséder une pleine duplication de son domaine catalytique (DD1 + DD2). Chez l'homme, HDAC6 possède deux domaines distincts qui lui confèrent une localisation cytoplasmique stable : un signal d'export nucléaire (NES) conservé dans son extrémité N-terminale et un domaine nommé SE14 qui assure l'ancrage de la protéine dans le compartiment cytoplasmique. Dans la région C-terminale de la protéine est retrouvé un domaine ZnF-UBP qui permet la fixation de la protéine avec une haute affinité aux molécules d'ubiquitine. SE14 : Tétradécapeptide contenant des enchaînements Ser-Glu ; ZnF-UBP : Ubiquitin hydrolase-like Zinc Finger. D'après Boyault *et al*, 2007a.

### III.2.2.2 Les substrats de HDAC6

Bien que la dénomination "histone déacétylase" soit utilisée dans un but de simplification pour la nomenclature, le premier substrat physiologique de HDAC6 découvert fut l' $\alpha$ -tubuline cytoplasmique (Hubbert *et al*, 2002; Matsuyama *et al*, 2002) et non les histones. Depuis, au moins trois autres substrats non-histones ont été identifiés : la chaperonne HSP90 (Bali *et al*, 2005; Kovacs *et al*, 2005) qui fait partie d'un complexe essentiel pour la stabilité et la fonction des "protéines clientes" importantes dans l'homéostasie cellulaire, mais aussi plus récemment la cortactine (Zhang *et al*, 2007a) et la  $\beta$ -caténine (Li *et al*, 2008). En revanche, même si une forte activité histone déacétylase est attribuée à HDAC6 "*in vitro*" (Grozinger *et al*, 1999; Haggarty *et al*, 2003; Zhang *et al*, 2003), une telle activité n'a toujours pas été démontrée "*in vivo*".

Malgré une rétention active de HDAC6 dans le cytoplasme (Verdel *et al*, 2000; Bertos *et al*, 2004), plusieurs études ont rapporté son interaction avec des protéines nucléaires ainsi que son impact sur l'activité transcriptionnelle de différents facteurs. Ainsi, des expériences de transfection transitoire ont montré que le recrutement de HDAC6 au niveau de promoteurs réprime la transcription, suggérant que la présence de HDAC6 dans le noyau aurait un impact sur l'activité de certains gènes (Westendorf *et al*, 2002; Girdwood *et al*, 2003; Zhang *et al*, 2003). De plus, des expériences de déacétylation réalisées « *in vitro* » indiquent que



l'extrémité N-terminale acétylée de l'histone H4 est susceptible d'être déacétylée par HDAC6 (Matsuyama *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2003). Ces observations laissent penser que HDAC6 pourrait participer à la déacétylation très localisée d'histones, dans certains types cellulaires ou en réponse à certains signaux spécifiques. Il a également été montré que HDAC6 peut interagir avec le facteur de transcription Runx2. La déacétylase est alors recrutée sur la chromatine et réprime l'activité du promoteur *p21<sup>WAF1</sup>* dans des lignées fibroblastiques ou ostéoblastiques (Westendorf *et al*, 2002). Par ailleurs, une association de HDAC6 avec des co-répresseurs transcriptionnels tels que LCoR (Ligand-dependent CoRepressor) a été décrite. Cette interaction identifie un mécanisme supplémentaire de répression par LCoR (Fernandes *et al*, 2003). HDAC6 interagit aussi avec la protéine HDAC11 localisée uniquement dans le noyau, même si les significations et les fonctions biologiques de cette interaction ne sont pas encore élucidées (Gao *et al*, 2002). Enfin, le recrutement de HDAC6 par l'histone acétyltransférase p300 sumoylée, exclusivement nucléaire, fournit un argument de plus pour une action de HDAC6 dans le noyau (Girdwood *et al*, 2003).

### III.2.2.3 Fonctions cellulaires de HDAC6

Une multitude de données indique un lien étroit entre la protéine HDAC6 et la voie ubiquitine-protéasome qui est le principal mécanisme de dégradation des protéines cellulaires. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle des protéines médiée par une cascade enzymatique, impliquant une enzyme d'activation de l'ubiquitine (Ub) E1, des enzymes de conjugaison E2, et des ubiquitine ligases E3, ces dernières existant en très grand nombre dans les cellules. La protéolyse médiée par la voie du protéasome implique deux étapes : une étape de polyubiquitination des substrats suivie par la dégradation des protéines ubiquitinylées par le complexe du protéasome 26S (Hochstrasser, 1996). Il a été montré que HDAC6 peut non seulement interagir avec des chaînes mono- et poly-ubiquitinylées (Seigneurin-Berny *et al*, 2001; Hook *et al*, 2002; Boyault *et al*, 2006), mais aussi former un complexe, tout du moins chez la souris, avec deux protéines impliquées dans la régulation de la dégradation dépendante de l'ubiquitine, nommées p97/VCP et PLAP (phospholipase A2 activating protein) (Seigneurin-Berny *et al*, 2001). Les fonctions dépendantes de l'ubiquitine de HDAC6 ont été par la suite investiguées et ont révélé que HDAC6 était impliquée dans le contrôle du « turn-over » des protéines ubiquitinylées. Ainsi, la fixation de haute affinité de HDAC6 à l'ubiquitine empêche la reconnaissance des protéines ubiquitinylées par d'autres facteurs fixant l'ubiquitine et retarde leur dégradation ultérieure par le protéasome ou par les

protéases spécifiques de l'ubiquitine (Boyault *et al*, 2006). Son activité de fixation de l'ubiquitine a également été montrée comme cruciale dans la réponse cellulaire protectrice envers l'accumulation des agrégats de protéines mal repliées et hautement ubiquitinylées. Ce mécanisme de défense utilise un transport actif dépendant des microtubules pour acheminer les agrégats protéiques disséminés dans la cellule vers des structures péricentriolaires appelées « agrégosomes » (Kawaguchi *et al*, 2003). HDAC6 joue également un rôle central dans l'interconnexion entre le dysfonctionnement du protéasome et l'activation de l'autophagie, un processus physiologique assurant le renouvellement des protéines et des organelles cellulaires par les lysosomes (Pandey *et al*, 2007). Enfin l'équipe de Saadi Khochbin a récemment démontré le rôle de HDAC6 dans une troisième voie de défense cellulaire contre l'accumulation d'agrégats protéiques, résultant en l'induction d'une réponse de type « choc thermique ». Celle-ci fait intervenir les chaperons moléculaires dits « de choc thermique » ou HSP (Heat Shock Protein) qui sont sous le contrôle transcriptionnel du facteur de transcription HSF1 (Heat Shock Factor 1). Suite à l'accumulation de protéines ubiquitinylées, HDAC6 peut induire la dissociation du complexe contenant HSF1 sous forme inactive, libérant ainsi HSF1 qui, activé, peut alors conduire la transcription des gènes *HSP* (Boyault *et al*, 2007b). En résumé, l'ensemble de ces données indique que HDAC6 coordonne toutes les voies de réponse cellulaire à l'accumulation cytotoxique des agrégats protéiques.

En outre, différentes études ont mis en évidence un rôle de HDAC6 dans les processus dépendants du cytosquelette tels que le remodelage du réseau d'actine et l'endocytose, les dynamiques de l'adhérence cellulaire et la motilité (Hubbert *et al*, 2002; Gao *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2007a).

### **III.3. Conséquences fonctionnelles de l'acétylation des protéines non-histones**

Le premier effet de l'acétylation réversible des lysines est la neutralisation de leur charge positive et par conséquent la modulation des propriétés électrostatiques et biochimiques des protéines qui portent cette modification post-traductionnelle. Ainsi, l'acétylation des protéines non-histones, au même titre que la phosphorylation, contrôle leurs fonctions, incluant leurs interactions protéine-protéine, leur stabilité, leur activité et leur localisation subcellulaire (pour revue, Glozak *et al*, 2005) (**Table 5**).

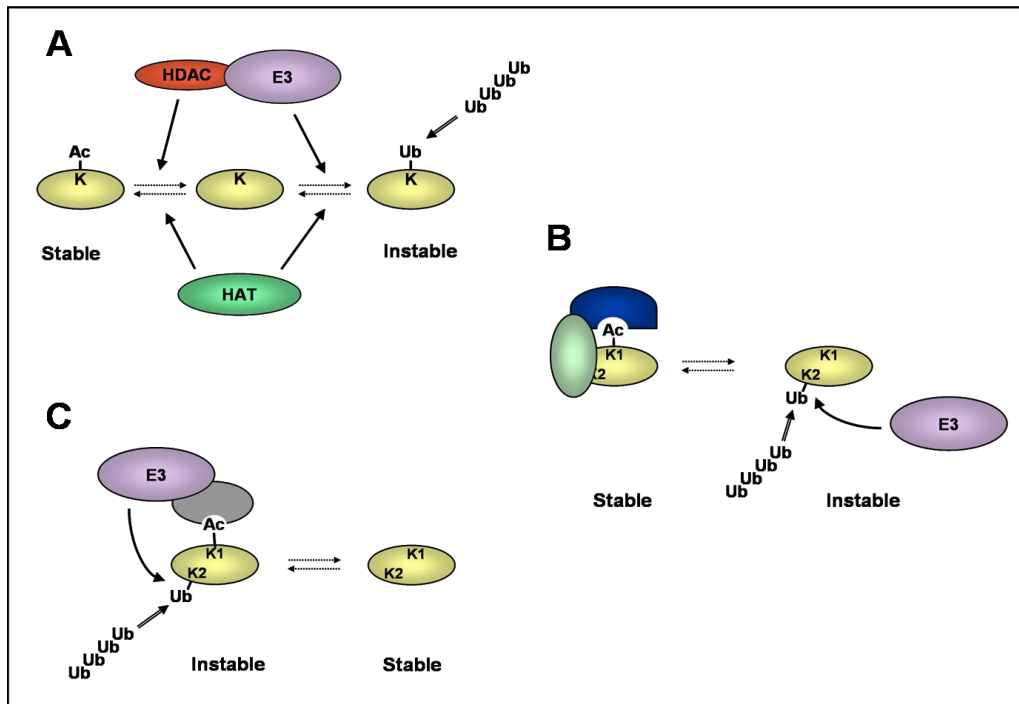
Implication biologique	Protéines acétylées	
Fixation à l'ADN	<b>Augmentation de la fixation à l'ADN</b>	<b>Diminution de la fixation à l'ADN</b>
	p53, STAT3, GATA, E2F1, p50 (NFκB), p65 (NFκB), c-Myb, MyoD, HNF-4, AML1, KLF13	HMG-A1, HMG-N2, YY1, Fen-1
Expression génique	<b>Activation transcriptionnelle</b>	<b>Inactivation transcriptionnelle</b>
	p53, STAT3, AR, GATA, EKLF, MyoD, E2F1, p65 (NFκB), p73, Bcl-6, β-caténine, KLF5, Sp1, RIP140	HIF-1α, STAT1, FOXO1, FOXO4
Stabilité protéique	<b>Augmentation de la stabilité protéique</b>	<b>Diminution de la stabilité protéique</b>
	p53, p73, β-caténine, Smad-7, c-Myc, Runx3, AR, E2F1, H2A.z, NF-E4, HNF6	HIF-1α, RB, GATA1, SV40 T-Ag
Interactions protéiques	<b>Augmentation</b>	<b>Diminution</b>
	STAT3, AR, EKLF, Importine A, STAT1, TFIIB, α-tubuline, actine, cortactine	p65(RelA), Ku70, HSP90
Localisation subcellulaire	<b>Ac → Noyau</b>	<b>Ac → Cytosol</b>
	P/CAF, SRY, PCNA, POP-1, HNF-4	c-Abl, p300, PAP

**Table 5 : Conséquences fonctionnelles de l'acétylation de protéines non-histones (liste non exhaustive).**

*D'après Spange et al, 2009.*

Il est maintenant bien établi que l'acétylation régule les propriétés de facteurs de transcription, telles que leur capacité à lier l'ADN et à activer la transcription (**Table 5**). Par exemple, l'acétylation de p53 et E2F1 augmente leur fixation à l'ADN et leur activité transcriptionnelle (Gu & Roeder, 1997; Martinez-Balbas *et al*, 2000). A l'inverse, l'acétylation des facteurs de transcription HMGI (high mobility group I) inhibe leur fixation à l'ADN (Munshi *et al*, 1998). L'acétylation des protéines régule aussi le « turn-over » des protéines (pour revue, Sadoul *et al*, 2008) (**Figure 20**). Ainsi, la plupart des exemples décrits dans la littérature désigne l'acétylation des lysines comme une modification post-traductionnelle stabilisatrice. L'acétylation rentre alors en compétition avec l'ubiquitination au niveau du même résidu lysine et stabilise la protéine acétylée. Dans ce cas, la balance entre les activités des HATs acétylant donc stabilisant les protéines et les HDACs les déacétylant donc stimulant leur dégradation contrôle le « turn-over » de ces protéines. En accord avec cette notion, il a été montré que des HDACs étaient impliqués dans le contrôle de la stabilité des facteurs de transcription p53 (Ito *et al*, 2002) et Runx3 (Runt-related transcription factor 3) (Jin *et al*, 2004). Plus récemment, il a aussi été démontré que l'acétylation accroît la stabilité des membres de la famille MYC (pour revue, Vervoorts *et al*, 2006) et de la β-caténine (Ge *et al*, 2009). Par ailleurs, lorsque l'acétylation et l'ubiquitination affectent deux résidus lysine différents, la stabilisation en réponse à l'acétylation pourrait être liée à un changement

conformationnel qui empêche l'ubiquitination ou bien à une stimulation de l'interaction de la protéine acétylée avec un partenaire qui masque le site d'ubiquitination (**Figure 20**). Par exemple, P/CAF acétyle et stabilise E2F1 par un mécanisme mettant en jeu une stimulation de l'interaction de E2F1 acétylé avec RB (Ianari *et al*, 2004). A l'inverse, d'autres observations indiquent que l'acétylation des lysines peut promouvoir la dégradation protéique (**Figure 20**). Le plus souvent, l'acétylation d'un résidu lysine génère une interaction avec une protéine partenaire, et notamment avec des E3 ubiquitine ligases, qui vont ubiquitinyler la protéine acétylée. C'est le cas pour HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) dont l'acétylation augmente son interaction avec pVHL, une ubiquitine ligase (Jeong *et al*, 2002) ou RB dont l'acétylation promeut son interaction avec MDM2 et possiblement son ubiquitination (Chan *et al*, 2001). De plus, l'acétylation de protéines chaperonnes telles que HSP90 peut modifier son interaction avec ses protéines « clientes » et conduire à leur dégradation (Yu *et al*, 2002).



**Figure 20 : Principaux mécanismes de régulation de la stabilité protéique mettant en jeu l'acétylation des lysines.**

(A) Stabilisation protéique par effet de compétition. Le site d'acétylation et le site d'ubiquitination sont localisés sur le même résidu lysine. Ainsi, l'acétylation de cette lysine empêche son ubiquitination et conduit à la stabilisation de la protéine. Dans ce contexte, les HATs assurent la stabilité de la protéine déubiquitinylée en protégeant le résidu lysine cible de l'action d'enzymes E3. A l'inverse, les HDACs laissent libre le résidu lysine accepteur d'ubiquitine et préparent la protéine à l'ubiquitination et à la dégradation par le protéasome. (B) La stabilisation protéique en réponse à l'acétylation peut être liée à une stimulation de l'interaction de la protéine acétylée avec des partenaires qui masque le site d'ubiquitination et la protège de l'activité E3 ubiquitine ligase. (C) Stimulation de la dégradation protéique par acétylation. L'acétylation d'un résidu lysine spécifique peut créer un site de fixation pour le recrutement d'un complexe à activité E3 ubiquitine ligase qui permet l'ubiquitination de la protéine et sa dégradation ultérieure par le protéasome.

Adapté d'après Caron *et al*, 2005.

De façon intéressante, les HATs et HDACs contrôlent aussi les voies de dégradation par le protéasome de protéines cibles en combinant plusieurs domaines fonctionnels au sein d'une même enzyme. Par exemple, il existe des enzymes combinant à la fois des activités d'acétylation et d'ubiquitination. C'est le cas de l'acétyltransférase p300/CBP qui possède une activité de poly-ubiquitination de type E4 qui fonctionne indépendamment de son activité HAT. Cette activité E4 est impliquée dans le contrôle de la stabilité de p53 (Grossman *et al*, 2003) et de Tip60 (Col *et al*, 2005). De même, l'acétyltransférase P/CAF renferme dans sa région N-terminale un domaine à activité E3 ligase (Linares *et al*, 2007). En outre, des HATs et HDACs sont retrouvées dans des complexes multi-protéiques contenant des enzymes de la machinerie de l'ubiquitination. Par exemple, l'acétyltransférase Tip60 interagit avec les E3 ubiquitine ligases MDM2 (Col *et al*, 2005; Legube *et al*, 2002) et Pirh2 (Logan *et al*, 2004), même si l'impact de cette interaction sur l'ubiquitination des substrats demeure largement inconnu. Un autre exemple est celui de HDAC1 qui s'associe avec MDM2 et déacétyle p53 permettant son ubiquitination et sa dégradation (Ito *et al*, 2002). Finalement, l'acétylation peut également influencer la stabilité protéique de manière plus indirecte. Ainsi, l'activité déacétylase de HDAC6 peut potentiellement contrôler la stabilité d'une variété de protéines cellulaires normalement stabilisées par HSP90, comme le récepteur aux glucocorticoïdes (Kovacs *et al*, 2005) et l'oncoprotéine de fusion RUNX1-ETO (Yang *et al*, 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'acétylation de l'ubiquitine E3 ligase MDM2 conditionne son inactivation et permet de stabiliser p53 (Wang *et al*, 2004).

A la lumière de ces nombreuses données, il est donc devenu évident que les HATs et les HDACs interviennent dans le contrôle de la demi-vie d'un grand nombre de protéines, et ce à différents niveaux.

### **III.4. Les inhibiteurs des histones déacétylases (HDACi)**

Comme nous avons pu le constater précédemment, le contrôle du niveau d'acétylation par les HATs et les HDACs constitue une étape essentielle dans la régulation de fonctions cellulaires. De ce fait, l'obtention de produits capables de moduler ces activités présente un intérêt évident, tant sur le plan cognitif qu'appliqué. A ce jour, il n'existe pas de molécules capables d'agir sur les HATs, même si il a été découvert qu'un co-répresseur transcriptionnel, appelé NIR (Novel INHAT Repressor), possédait une activité inhibitrice à l'encontre des

HATs p300/CBP et P/CAF (Seo *et al*, 2001). En revanche, de nombreux composés d'origine naturelle, en particulier des antibiotiques antifongiques, se sont révélés exercer une puissante action d'inhibition des HDACs.

### III.4.1 Classification des inhibiteurs de HDACs

Il existe de nombreux inhibiteurs de HDACs des classes I et II qui sont répertoriés en quatre grandes familles en fonction de leur structure chimique (Marks *et al*, 2004) :

(i) Les dérivés d'acide hydroxamique : dans cette classe, on retrouve notamment la trichostatine A (TSA), un antifongique naturel, et le suberoylanilide hydroxamic acide (SAHA) qui sont deux des inhibiteurs de HDACs les plus connus.

(ii) Les tetrapeptides cycliques : ils constituent la classe la plus complexe au niveau structurel. On y retrouve notamment le depsipeptide, la trapoxine A (TPX), un métabolite fongique, et l'apidicine.

(iii) Les acides gras à chaîne courte : les principaux inhibiteurs de cette classe sont le sodium butyrate (NaBu), le phénylbutyrate et l'acide valproïque. Le NaBu a été la première molécule inhibitrice de HDACs décrite (Boffa *et al*, 1978). Il est le plus employé dans les études « *in vitro* » (Davie *et al*, 2003) mais son utilisation a été abandonnée dans les études « *in vivo* » du fait de sa courte durée de demi-vie et de ses effets obtenus qu'à de fortes concentrations.

(iv) Les benzamides : la molécule la plus utilisée de cette classe est le MS-275. Leur pouvoir inhibiteur de HDACs est moins puissant que pour les autres classes.

Les HDACs de classe III sont inhibées par un nombre plus restreint de molécules. On peut citer par exemple le nicotinamide (Jackson *et al*, 2003) et le sirtinol (Grozinger *et al*, 2001). Des inhibiteurs naturels de SIRT1 ont également été identifiés (Olaharski *et al*, 2005).

### III.4.2 Mécanisme d'action et effets biologiques des HDACi

Les inhibiteurs de HDACs agissent vraisemblablement par l'intermédiaire de leurs parties acycliques qui miment la chaîne latérale acétylée des lysines, et via l'inactivation du site catalytique des HDACs par les différents groupements réactifs terminaux qui les composent (époxyde, hydroxymate,...). Ce blocage de la déacétylation peut être irréversible comme c'est le cas de la trapoxine A qui forme une liaison covalente entre son groupe

époxyde et les HDACs, ou réversible comme pour la TSA ou le NaBu. Tous les HDACi présentent une large gamme d'effets sur des cellules en culture et dans des modèles animaux. Ces effets incluent l'activation ou la répression spécifique de gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, la sénescence et l'apoptose. De façon intéressante, les HDACi agissent préférentiellement sur les cellules tumorales, même si le mécanisme exact de cette sélectivité reste encore à être élucidé (pour revues, Xu *et al*, 2007; Marks & Xu, 2009).

Les HDACi agissent sur les gènes de manière sélective. En effet, dans des cellules tumorales traitées à la TSA ou au SAHA, la transcription de seulement 2% des gènes exprimés est altérée (soit augmentée, soit diminuée, de deux fois ou plus) comparativement aux cellules contrôles non traitées (Van Lint *et al*, 1996). Néanmoins, la base de cette sélectivité est à ce jour encore inconnue. Un des gènes les plus fréquemment induits par les HDACi code pour la protéine p21<sup>WAF1</sup>, un inhibiteur des complexes cdk/cycline qui joue un rôle déterminant dans l'arrêt du cycle cellulaire. p21<sup>WAF1</sup> est activé transcriptionnellement le plus souvent par un mécanisme indépendant de p53. Cette induction pourrait expliquer le blocage des cellules en phases G1 et G2/M du cycle cellulaire qui est fréquemment observé dans les cellules traitées avec des HDACi. D'autres gènes couramment induits incluent la gelsoline, p16<sup>INK4A</sup> et p27<sup>KIP1</sup> (Hoshikawa *et al*, 1994; Kim *et al*, 1999). Parmi les gènes réprimés par les HDACi, on retrouve la cycline D1 (Kim *et al*, 1999) et la thymidylate synthétase (Glaser *et al*, 2003). En outre, les gènes codant pour les HDACs sont eux-mêmes induits après traitement par les HDACi (Dangond & Gullans, 1998).

Les HDACi peuvent aussi provoquer l'apoptose via leur capacité à induire des gènes pro-apoptotiques tels que FAS ou BAK. Tous les HDACi étudiés activent à la fois la voie extrinsèque des récepteurs de mort et la voie intrinsèque médiée par la perturbation de la membrane mitochondriale (Peart *et al*, 2003; Rosato *et al*, 2003). Toutefois, il a été montré dans plusieurs systèmes expérimentaux que la mort cellulaire induite par les HDACi est caractérisée par l'altération du profil du cycle cellulaire avec une perte des cellules en G1 et en S, et l'accumulation de cellules contenant de l'ADN 4n, consistant avec un arrêt du cycle en G2/M (Peart *et al*, 2003). Ces données suggèrent un effet double de ces molécules d'inhibition du cycle cellulaire et d'induction d'apoptose. En accord avec cela, la TSA inhibe la croissance de lignées de cancer pulmonaire en bloquant le cycle cellulaire et en provoquant l'apoptose via l'activation des récepteurs de mort et de la voie mitochondriale (Kim *et al*, 2006b; Platta *et al*, 2007).

De nombreux HDACi inhibent l'angiogenèse en empêchant la formation de nouveaux vaisseaux via l'altération de la signalisation du VEGF (Kim *et al*, 2001; Deroanne *et al*, 2002). Par ailleurs, certains HDACi possèdent des propriétés anti-métastatiques et peuvent empêcher l'invasion tumorale à travers la régulation négative de l'expression des métalloprotéases matricielles (Liu *et al*, 2003b). Enfin, il a été démontré que les HDACi répriment l'expression du gène de la télomérase, indiquant que ces agents peuvent induire des effets anti-prolifératifs en interférant également avec les programmes de sénescence cellulaire (Nakamura *et al*, 2001).

## III.5. Acétylation et cancer

### III.5.1 Activité HDAC et/ou HAT aberrante associée au cancer

De façon importante, la majorité des protéines régulées par acétylation joue des rôles clés dans l'oncogenèse et la progression tumorale. Ainsi, des modifications dans l'expression et/ou l'activité des enzymes impliquées dans l'acétylation ainsi que la rupture de l'équilibre entre les niveaux d'acétylation et de déacétylation pourraient jouer un rôle crucial dans la transformation cellulaire et l'acquisition d'un phénotype tumoral. En accord avec cette hypothèse, des activités aberrantes des HATs et HDACs sont fréquemment observées dans les cellules cancéreuses, notamment dans les leucémies et les lymphomes.

L'activité HAT est perturbée dans un grand nombre de cancers, par translocation, amplification, surexpression ou mutation. En particulier, des mutations faux-sens ou la délétion de p300 ont été identifiées dans des tumeurs primaires colorectales et gastriques ainsi que dans d'autres cancers épithéliaux (Gayther *et al*, 2000). D'autre part, une perte mono-allélique du gène *Tip60* est fréquemment retrouvée dans les lymphomes, les carcinomes de la tête et du cou et les carcinomes mammaires, avec une réduction concomitante du niveau d'expression des transcrits codant pour Tip60. Une analyse immunohistochimique a de surcroît démontré la perte du marquage nucléaire de Tip60 dans les carcinomes du sein qui corrèle avec le grade de la pathologie (Gorrini *et al*, 2007). Par ailleurs, il a été décrit une diminution significative de l'expression de la protéine Tip60, ainsi que des niveaux de ses transcrits, dans les carcinomes coliques et pulmonaires en comparaison avec leur tissu normal associé (LLeonart *et al*, 2006). Ces données suggèrent un modèle dans lequel Tip60 se



comporterait comme un suppresseur de tumeur haplo-insuffisant. Cependant, Tip60 est aussi un co-activateur de c-Myc, du récepteur aux androgènes, de NF- $\kappa$ B et de E2F1, qui sont connus pour participer au processus de transformation et/ou au développement tumoral (Gaughan *et al*, 2002; Patel *et al*, 2004; Taubert *et al*, 2004). Ainsi, en fonction du contexte cellulaire, l'acétyltransférase Tip60 pourrait se comporter comme un oncogène ou comme un gène suppresseur de tumeur.

De la même façon que les HATs, les HDACs sont requises pour la croissance cellulaire et jouent un rôle dans le développement et la progression des cancers humains, en réprimant notamment l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et d'inhibiteurs du cycle cellulaire. La surexpression des HDACs des classes I et II est observée dans de nombreux types de cancers. Par exemple, HDAC1 est surexprimée dans les cellules du cancer de la prostate, tandis que HDAC2 est surexprimée dans les carcinomes gastriques et colorectaux, dans les dysplasies cervicales ainsi que dans les sarcomes du stroma endométrial, son expression étant corrélée à une diminution de l'expression de p21<sup>WAF1</sup> (Huang *et al*, 2005; Song *et al*, 2005; Hrzenjak *et al*, 2006; Weichert *et al*, 2008). HDAC3 est surexprimée dans les cancers du colon et inhibe également l'expression de p21<sup>WAF1</sup> (Wilson *et al*, 2006). Par ailleurs, des niveaux élevés de HDAC6 ont été décrits dans des tissus et lignées cellulaires dérivés de carcinomes primaires oraux à cellules squameuses, des leucémies myéloïdes aiguës, plusieurs lignées cellulaires myeloblastiques ainsi que dans certains cas de cancers mammaires humains (Yoshida *et al*, 2004; Bradbury *et al*, 2005; Saji *et al*, 2005; Sakuma *et al*, 2006). L'expression des HDACs de classe III est largement affectée dans les cellules tumorales. Ainsi, SIRT1 est surexprimée dans les cancers de la prostate (Huffman *et al*, 2007) et l'expression de SIRT3 et SIRT7 est augmentée dans les cancers mammaires à nodules (Ashraf *et al*, 2006). A l'inverse, l'expression SIRT2 est dramatiquement diminuée dans les gliomes humains (Hiratsuka *et al*, 2003). De même, SIRT4 est invariablement sous-exprimée dans une grande variété de leucémies myéloïdes aiguës (Bradbury *et al*, 2005).

Les mécanismes par lesquels la surexpression de ces différentes HDACs contribue au processus de cancérisation sont variables. Par exemple, certaines HDACs s'associent à des protéines oncogéniques issues de translocation dans des formes spécifiques de leucémies (Pandolfi, 2001) et de lymphomes (Dhordain *et al*, 1998). Par exemple, la leucémie aiguë promyélocytaire est associée à des translocations chromosomiques conduisant à des oncoprotéines de fusion chimériques PML-RAR $\alpha$  et PLZF-RAR $\alpha$  qui fonctionnent comme des répresseurs transcriptionnels aberrants, notamment via le recrutement de HDACs et

l'altération de la régulation normale des gènes (Lin *et al*, 1998; Pandolfi, 2001). De plus, l'hypoxie, souvent rencontrée au cœur des tumeurs solides, accroît l'angiogenèse et induit également l'expression et l'activité des HDACs. La surexpression de HDAC1 réprime les suppresseurs de tumeurs p53 et VHL (von Hippel-Lindau) mais induit les gènes de réponse à l'hypoxie que sont HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor- $\alpha$ ) et le VEGF (vascular endothelial growth factor) augmentant de ce fait l'angiogenèse (Kim *et al*, 2001).

### III.5.2 Les inhibiteurs de HDACs en thérapie anticancéreuse

L'effet drastique des inhibiteurs de HDACs « *in vitro* » a rapidement conduit à tester leur effet clinique dans différents types de tumeurs solides et hématologiques. A ce jour, au moins 14 HDACi sont en phase avancée de développement clinique, y compris en phase III (**Table 6**) (pour revue, Xu *et al*, 2007). Même si certaines de ces molécules méritent assurément un développement supplémentaire concernant notamment les doses et modes d'administration, tous les HDACi testés présentent une activité clinique au moins partielle témoignant bien de leur pouvoir anti-cancéreux. Un des problèmes potentiels de l'utilisation des HDACi actuellement étudiés est leur non sélectivité car ils ciblent aussi bien les HDACs de classe I que celles de classe II. D'ailleurs, leurs propriétés anti-tumorales se manifestent à travers plusieurs activités sans distinction spécifique de(s) HDAC(s) responsable(s) de l'effet observé et pourraient être liées à des mécanismes dépendants du niveau d'acétylation de protéines non histones tels que les facteurs de transcription.

Les inhibiteurs de HDACs peuvent être associés à des composés classiquement utilisés lors des chimiothérapies. L'avantage de cette approche est tout d'abord de se baser sur un traitement existant partiellement efficace. Ensuite, le mélange de molécules possédant des modes d'action très différents peut engendrer un effet de synergie dirigé contre les cellules cancéreuses. Enfin, cette approche pourrait permettre de réduire les concentrations requises du composé chimiothérapeutique, limitant de cette manière les effets secondaires. C'est ainsi que le phénylbutyrate sensibilise des cellules B tumorales à l'action de différentes molécules comme la doxorubicine, l'étoposide, le cisplatine ou encore la fludarabine (Witzig *et al*, 2000). De même, le depsipeptide augmente l'effet thérapeutique du docétaxel, un agent chimiothérapeutique utilisé notamment dans le traitement du cancer de la prostate (Zhang *et al*, 2007b). L'implication des HDACi dans l'induction spécifique de la mort des cellules cancéreuses est un point important à souligner puisqu'il individualise certainement cette classe de médicaments et la rend très prometteuse comparée aux drogues conventionnelles.

Malgré les nombreux progrès qu'il reste encore à accomplir dans la caractérisation des HDAC et de leur inhibition sélective ou non, il ne fait aucun doute aujourd'hui que la modulation de l'activité de ces enzymes ouvre une ère innovante pour le développement de nouvelles stratégies anticancéreuses.

Classe	Composé	Spécificité HDAC	IC50	Stade de développement	Cancer
<b>Acides gras à chaîne courte</b>	Butyrate	Classe I, IIa	mM	Phase I, II	Leucémie, myélodysplasie, lymphome, cancer de l'intestin
	Acide valproïque (VPA)	Classe I, IIa	mM	Phase I, II	Leucémie, myélodysplasie, tumeurs solides diverses
	AN-9 (prodrugue)	ND	µM	Phase I, II	Cancer du poulmon, mélanome, leucémie
<b>Dérivés d'acide hydroxamique</b>	Trichostatine A (TSA)	Classe I, II	nM	ND	Leucémie, lymphome, myélome, tumeurs solides diverses
	Acide hydroxamique Suberoylamide (SAHA)	Classe I, II	µM	FDA*	Lymphome T cutané, mésothéliome
	PXD101	Classe I, II	µM	Phase I, II	Tumeur solide, leucémie, lymphome
	Oxamflatine	Classe I, II	nM	ND	Tumeur solide, leucémie, lymphome
	LAQ824	Classe I, II	nM	Phase I, II	Leucémie, lymphome, myélome, cancer de l'intestin
	LBH589	Classe I, II	nM	Phase III	Myélome, leucémie
	Acide M-Carboxycinnamique Bishydroxamique (CBHA)	ND	µM	Phase I, II	Tumeur solide, leucémie
	ITF2357	Classe I, II	nM	Phase I, II	Leucémie, lymphome, myélome
	PCI-24781	Classe I, II	ND	Phase I, II	Leucémie, lymphome, myélome
	Pyroxamide	HDAC1, 2	µM	Phase I	Leucémie, myélodysplasie, lymphome, cancer de l'intestin
	<b>Tétrapeptides cycliques</b>	Depsipeptide (FK228)	Classe I	nM	Phase I, II
Trapoxine A		Classe I, IIa	nM	ND	
Apicidine		HDAC1, 3	nM	ND	
<b>Benzamides</b>	MS-275	HDAC1, 2, 3	µM	Phase I, II	Tumeur solide, leucémie, lymphome
	N-acétyldinaline (CI-994)	ND	µM	Phase I, II, III	Cancer du poulmon, du pancréas, du rein
	MGCD0103	Classe I	nM	Phase I, II	Leucémie, lymphome

**Table 6 : Différents inhibiteurs de HDACs actuellement utilisés en phase clinique (liste non exhaustive).**

IC50: 50% de la concentration inhibitrice maximale; ND: non disponible; FDA\*: inhibiteurs approuvés par la Food and Drug Administration des Etats-Unis pour les lymphomes T cutanés.

Adapté d'après Bolden et al, 2006; Xu et al, 2007. Source principale : <http://clinicaltrials.gov/>.

Le cancer du poumon résulte de l'accumulation séquentielle d'anomalies génétiques et/ou épigénétiques au niveau de gènes clés contrôlant la division cellulaire, l'apoptose et/ou la sénescence. L'identification des événements moléculaires impliqués dans le développement tumoral offre des perspectives pour mieux connaître l'évolution de la maladie, pour identifier d'éventuels facteurs pronostiques mais aussi pour développer des nouvelles approches préventives et outils de détection précoce et thérapeutique.

Depuis plusieurs années, l'équipe qui m'a accueillie concentre ses efforts sur les voies de signalisation de 2 gènes suppresseurs de tumeur, p53 et RB, et travaille sur les mécanismes moléculaires conduisant à l'invalidation quasi-constante de ces voies dans les tumeurs bronchiques et sur l'étude des conséquences fonctionnelles d'une telle inactivation. Le facteur de transcription E2F1 est situé à l'interface de ces voies. Des travaux antérieurs de l'équipe ont décrit son expression différentielle dans les cancers bronchiques (Eymin *et al*, 2001), indiquant qu'une dérégulation de l'activité de E2F1 contribue probablement au processus de carcinogenèse bronchique. L'identification de nouvelles cibles et fonctions de E2F1 dans des modèles cellulaires dérivés de carcinomes pulmonaires a donc constitué ces dernières années l'un des objectifs de recherche de l'équipe que j'ai intégrée.

Dans ce contexte, à mon arrivée au laboratoire, j'ai participé à une étude dans laquelle nous avons identifié le facteur d'épissage de la famille des protéines SR, la protéine SC35, comme une nouvelle cible transcriptionnelle de E2F1. De façon importante, nous avons aussi montré que E2F1 et SC35 coopèrent pour induire l'apoptose de cellules de carcinomes pulmonaires en réponse à un stress génotoxique, via la modulation du profil d'épissage de certains gènes apoptotiques, en faveur des variants d'épissage codant pour les isoformes pro-apoptotiques. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans *Cell Death and Differentiation* (Merdzhanova, Edmond *et al*, 2008, pages 1815-1823).

Ces travaux ont été la première évidence d'un lien entre la protéine E2F1 et les facteurs d'épissage de la famille des protéines SR. Ils nous ont conduits à approfondir le rôle des protéines SR, et notamment de la protéine SC35, dans nos modèles cellulaires afin de caractériser de nouvelles fonctions biologiques de cette protéine, susceptibles à terme de participer au processus de carcinogenèse bronchique en réponse ou non à une dérégulation de E2F1.

Dans ce contexte, les objectifs plus spécifiques de mon travail de thèse étaient doubles. Premièrement, nous avons cherché à caractériser de nouvelles modifications post-traductionnelles de SC35 susceptibles de contrôler son expression et/ou son activité. L'acétylation des protéines non-histones étant une modification post-traductionnelle affectant l'activité des protéines, nous avons postulé que la protéine SC35 pourrait être régulée par acétylation. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré « *in vitro* » et « *in vivo* » que la protéine SC35 est une protéine acétylable. Nous avons décrit pour la première fois un rôle de l'acétylation dans le contrôle de l'expression d'une protéine SR et démontré qu'une balance mettant en jeu l'histone acétyltransférase Tip60 et l'histone déacétylase HDAC6 régule finement le niveau d'expression de SC35. Par ailleurs, nous avons mis en évidence un dialogue entre le statut d'acétylation et de phosphorylation de SC35 dans le contrôle du processus apoptotique mis en jeu lors de la réponse cellulaire au stress génotoxique. Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication actuellement soumise à EMBO Journal (Edmond *et al*, soumis).

L'identification de cette nouvelle modification post-traductionnelle de type acétylation nous a poussés à investiguer, parallèlement, le rôle que pourraient exercer les inhibiteurs de HDACs (HDACi) sur le niveau d'expression de la protéine SC35. Nous avons montré que SC35 s'accumule sous forme acétylée et hypophosphorylée en réponse au sodium butyrate (NaBu), un inhibiteur de HDACs, par un mécanisme mettant lui aussi en jeu Tip60 et HDAC6. Dans ce contexte, nous avons identifié une nouvelle fonction biologique de SC35 dans l'inhibition de la croissance cellulaire. Ainsi, nous avons montré que SC35 est nécessaire à l'induction de l'inhibiteur des complexes cycline/CDK p21<sup>WAF1</sup>, ainsi qu'à la mise en place d'un phénotype de sénescence cellulaire dans nos modèles cellulaires déficients en p53 et traités par le NaBu. Ces résultats décrivent pour la première fois un rôle de la protéine SC35 dans le contrôle de la sénescence prématurée de cellules tumorales. Ils font l'objet d'une seconde publication qui devrait être prochainement soumise au journal Cell Cycle (Edmond *et al*).

Le caractère ambivalent du facteur de transcription E2F1 (facteur prolifératif versus pro-apoptotique) nous a amené à définir les seconds objectifs de mon travail de thèse qui consistaient à déterminer si le facteur d'épissage SC35 était également impliqué dans le contrôle des fonctions prolifératives de E2F1. Cette étude a été menée principalement sur des lignées cellulaires dérivées de carcinomes pulmonaires neuroendocrines de haut grade de malignité qui surexpriment E2F1, dans lesquelles l'expression de SC35 (élevée dans ces

modèles) a été neutralisée par ARN interférence. Tout d'abord, nous avons obtenu des résultats indiquant que l'expression de la protéine SC35 est régulée au cours du cycle cellulaire, avec un pic d'expression lors de la transition G1/S et la progression en phase S. De plus, nous avons montré que l'inactivation de SC35 affecte négativement l'expression de gènes cibles de E2F1 codant pour des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire en phase S et notamment dans la réplication de l'ADN. D'un point de vue moléculaire, nous avons démontré l'existence d'une interaction directe entre les protéines E2F1 et SC35 et obtenu des résultats montrant que SC35 stimule l'activité transactivatrice de E2F1 au niveau du promoteur de certains de ses gènes cibles, notamment la cycline E. Finalement, nous avons montré que la voie dépendante de la kinase AKT est impliquée dans la phosphorylation de SC35 et dans l'activation de ses cibles dans nos modèles d'études. L'ensemble de ces données suggère donc que SC35 pourrait agir comme un co-activateur de l'activité transcriptionnelle de E2F1 pour l'induction de certains de ses gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire et fait l'objet d'un manuscrit actuellement en préparation (Edmond *et al*, en préparation).

# I. ARTICLE 1

## **Post-translational modifications of SC35 control cell fate decision in response to cisplatin**

Valerie Edmond<sup>1,2</sup>, Elodie Moysan<sup>1,2</sup>, Saadi Khochbin<sup>2,3</sup>, Patrick Matthias<sup>4</sup>, Christian Brambilla<sup>1,2</sup>, Elisabeth Brambilla<sup>1,2</sup>, Sylvie Gazeri<sup>1,2</sup> and Beatrice Eymin<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, 38042, France.

<sup>2</sup> Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, 38041, France.

<sup>3</sup> INSERM, U823, Equipe 6, Epigénétique et Signalisation cellulaire, Grenoble, 38042, France.

<sup>4</sup> Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Novartis Research Foundation, 4058 Basel, Switzerland.

Running title: Acetylation controls SC35 protein level

Corresponding author:

Dr. Beatrice Eymin

INSERM U823 Equipe 2

Institut Albert Bonniot, BP170

38042 Grenoble Cedex 09, FRANCE

Tel: +33 4 76 54 94 76 / Fax: +33 4 76 54 94 13

email: [Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr](mailto:Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr)

To whom requests for reprints should be addressed

## Abstract

SC35 is a Ser-Rich/Arg protein belonging to the family of SR proteins that are crucial regulators of constitutive and alternative pre-mRNA splicing. Although it is well-known that phosphorylation inside RS domain controls SR proteins activity, other post-translational modifications regulating SC35 functions have not been described to date. In this study, we provide the first evidence that the acetyltransferase Tip60 acetylates SC35 on its lysine 52 residue inside the RNA Recognition Motif and promotes its proteasomal degradation. We also demonstrate that the deacetylase HDAC6 counters this acetylation and acts as a positive regulator of SC35 protein level. In addition, we show that Tip60 down-regulates SC35 phosphorylation by inhibiting the nuclear translocation of both SRPK1 and SRPK2 kinases. Finally, we demonstrate that this acetylation/phosphorylation signaling network is required for SC35 accumulation and for the control of *caspase-8* pre-mRNA splicing in response to cisplatin, and directs by this way the cell fate, growth arrest versus apoptosis. Taken together, these results unravel lysine acetylation as a crucial post-translational modification regulating SC35 protein activity in response to genotoxic stress.

Key Words: Acetylation/Phosphorylation/SC35/SRPK/Tip60.

Category: Proteins/Differentiation & Death



## **Introduction**

Pre-mRNA splicing consists of a highly regulated cascade of events that are critical for gene expression in higher eukaryotic cells. This process has emerged as an important mechanism of genetic diversity as about 74% of human genes undergo alternative splicing, leading to the synthesis of various protein isoforms with different biological properties (Johnson et al., 2003). SC35 belongs to the serine/arginine-rich (SR) protein family, one of the most important class of splicing regulators that play a prominent role in splice-site selection, in multiples steps of spliceosome assembly as well as in both constitutive and alternative splicing (Graveley, 2000). All members of the SR protein family share a modular organization and contain one or two N-terminal RNA recognition motifs (RRM) that interact with the pre-mRNA and influence substrate specificity (Liu et al., 1998), as well as a C-terminal serine/arginine-rich sequence known as the RS domain that functions as a protein-protein interaction module (Wu and Maniatis, 1993). SR proteins activity is highly regulated by extensive and reversible phosphorylation of serine residues inside RS domain. These phosphorylations modulate protein-protein interactions within the spliceosome and can influence RNA-binding specificity, splicing activity and sub-cellular localization. To date, numerous kinases phosphorylating SR proteins have been identified. They include the SRPK and CLK/STY family kinases that are highly specific for RS domain-containing splicing factors, the DNA topoisomerase I and AKT (Stamm, 2008). However, data addressing cellular signals that control phosphorylation of SR proteins remain scarce, as well as the specific kinases involved in these effects.

Chromatin biology and pre-mRNA splicing have been considered for a long time as two independent fields. However, recently, chromatin structure has been shown to affect both constitutive and alternative splicing, either through the recruitment of splicing factors (Sims et al., 2007) or through the modulation of RNA polymerase II elongation rate (Batsche et al., 2006). In addition, two studies have demonstrated that DNA sequences associated with nucleosomes are preferentially located in exons (Schwartz et al., 2009; Tilgner et al., 2009), providing a general concept for how the architecture of genome packaging could influence pre-mRNA splicing. Chromatin structure is highly controlled by post-translational modifications of histone proteins tails including phosphorylation or acetylation. These modifications are catalyzed by chromatin-modifying enzymes that add or remove specific

groups in a reversible way. It was recently reported that two SR proteins, namely SRp20 and SF2/ASF, bind histone H3 tail to control cell cycle progression, in a manner that depends on H3 phosphorylation on its serine 10 residue (Loomis et al., 2009). These data provide the first evidence that SR proteins associate with chromatin, and suggest that they could be directly targeted by components of chromatin-remodeling complexes. Lysine acetylation is highly regulated through the opposite actions of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) enzymes. Besides histones, an increasing number of cellular proteins are also subjected to lysine acetylation (Yang and Seto, 2008). Recently, a high-resolution mass spectrometry analysis revealed that a large number of acetylation sites are present on proteins implicated in splicing, including SR proteins, and identified the RNA recognition motif as a major domain for acetylation (Choudhary et al., 2009). These data support the idea that lysine acetylation could regulate SR proteins function. In this study, we demonstrate for the first time that an acetylation/phosphorylation network controls the turn-over and activity of the splicing factor SC35 in response to genotoxic stress. Therefore, besides phosphorylation, lysine acetylation also appears as a crucial post-translational modification of SR proteins.

## Materials and Methods

### Cell lines, cell treatments, plasmids and transfection

H358, H1299, H810, H69 human lung carcinoma cell lines and SAOS2 osteosarcoma cells were cultured as described (Merdzhanova et al., 2008; Salon et al., 2007). The parental and HDAC6<sup>-/-</sup> 3T3 cell lines, as well as the 3T3 cell lines derived from HDAC6-deficient cells re-expressing wild-type HDAC6 (+WT) or HDAC6 bearing mutations either in the two catalytic deacetylase domains (HD<sup>m</sup>) or in the ZnF-UBP ubiquitin-binding domain (Ub<sup>m</sup>) have been previously described (Boyault *et al*, 2007a). They were maintained in DMEM (GibcoBRL) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS, 2mM L-glutamine and 100U/ml penicillin/streptomycin in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Proteasome inhibition was achieved by treating cells with 3μM MG132 (Sigma) for 18h. Protein translation inhibition was achieved by treating cells for different times with 15μg/ml cycloheximide (CHX; Sigma). Protein acetylation was enhanced by an 18-hour treatment of the cells with 100ng/ml TSA before cell lysis. Transient transfections were carried out using Fugene 6 (Roche Diagnostic, Meylan,

France) according to the manufacturer's instructions. Plasmids used in transient transfections were pcDNA3.1, pcDNA3.1-HA-SC35, pcDNA3.1-HA-SC35(K52R), pcDNA3.1-GFP-SC35, pcDNA3.1-HA-Tip60, pcDNA3.1-HA-Tip60<sup>G380</sup> and pcDNA3.1-Flag-hHDAC6. K52R point mutation in SC35 was introduced by QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) using pcDNA3.1-HA-SC35 as a template and confirmed by DNA sequencing.

### **Cellular fractionation**

Cells were collected, washed twice with PBS and resuspended in 10 volumes of hypotonic buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM dithiothreitol (DTT), supplemented with protease inhibitor cocktail) for 15 min on ice. The swelled cells were pelleted following centrifugation at 2000 rpm for 10 min and lysed in 5 volumes of hypotonic buffer containing 0.9% NP40 for 10 min on ice. Nuclei were pelleted by centrifugation at 3000 rpm and the supernatant (cytoplasmic extract) was kept. Nuclei were washed twice with PBS, lysed in RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Nonidet P40, 0.5% Na deoxycholate) containing protease inhibitors and homogenized by sonication.

### **DNA content analysis and active caspase-3 detection by flow cytometry**

For DNA content analysis, cells were fixed in cold ethanol 70% for 30 min on ice, treated with RNase A (20µg/ml) for 20 min at 37°C and stained with propidium iodide (10µg/ml). For detection of active caspase-3, cells were washed twice with ice-cold 1X PBS, fixed and permeabilized using a Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min on ice, then intracellular active caspase-3 was stained using a PE-conjugated anti-active caspase-3 antibody for 30 min at room temperature in the dark. In all cases, flow cytometric analysis of 10000 cells was performed on a FACScan flow cytometer (BD Biosciences) and data were recovered using the CellQuest software (BD Biosciences).

### **Antibodies**

The anti-SC35 (H-55), anti-HDAC6 (H-300), anti-GFP (B-2) and anti-HA-probe (Y-11) antibodies were purchased from Santa Cruz (TEBU, Le Perray en Yvelines, France), the anti-E2F1 (KH95), anti-SRPK1 and anti-SRPK2 from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), the anti-actin (A2066) and anti-tubulin (B512) from Sigma, the anti-SC35 (4F11) from Euromedex (Souffelweyersheim, France), the anti-SF2/ASF from Zymed, the anti-

phosphorylated SC35 and anti-histone H3 from Abcam (Paris, France), the anti-HA.11 from Covance and the anti-acetyl lysine from Cell Signaling (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). The anti-cleaved caspase-3 (E83-77) was from Epitomics (Euromedex). The anti-SR antibody mAb104 (mouse hybridoma) recognizing a phospho-epitope within the RS domain of SR proteins was obtained from ATCC. The rabbit anti-Tip60 antibody was synthesized after rabbit immunization with two peptides representative of the C- and N-terminal moiety of the Tip60 protein (Covalab, Villeurbanne, France). The antibody targeting the acetylated K52 residue on SC35 was obtained from Covalab following rabbit immunization with a modified peptide mimicking a K52 acetylation. Immunoprecipitation and western blotting experiments were performed as previously described (Salon et al., 2006).

### ***In vitro* acetylation assays**

Distinct cDNA encoding truncated forms of SC35 protein were fusionned in frame with GST by sub-cloning into pGEX-6P3 plasmid. Beads coated with GST, GST-SC35(1-60), GST-SC35(60-115) or GST-SC35(115-221) fusion proteins were prepared according to the manufacturer's protocol (Bulk GST Purification module, Pharmacia Biotech). "*In vitro*" acetyltransferase assays were performed using 2 µg of each recombinant GST-SC35 fusion peptides, 1 µg of recombinant His-tagged Tip60<sup>212-513</sup> or His-tagged GCN5 protein and 0.05 µCi of [<sup>14</sup>C]acetyl-CoA, as described previously (Leduc et al., 2006).

### **Transfection of siRNA oligonucleotides**

The sequences designed to specifically target human *sc35*, *Tip60*, *HDAC6*, *srpk1* and *srpk2* RNAs were purchased from Eurogentec (Angers, France) and were as follows: for *sc35*, 5'-UCGAAGUCUCGGUCCCGCACUCG-3' and 5'-GAGGACGCUAUGGAUGCCAUGGACG-3'; for *Tip60*, 5'-GAAGAUCAGUCCCCAAG-3' and 5'-CGAAACGGAAGGUGGAGGU-3'; for *HDAC6*, 5'-GAUGUUGGUUCACAGCCUAGA-3' and 5'-CCCAAGAGUGCUUAUUUAAGU-3'; for *srpk1*, 5'-GCUAAUGACUGUGAUGUCCAAAA-3'; for *srpk2*, 5'-UCCCAGUACAUUGGACCUGAAA-3'. For all RNA interference experiments, the *mismatch* siRNA oligonucleotide used as a control was 5'-UCGGCUCUUACGCAUUCAA-3'. Cells were transfected with siRNA oligonucleotides duplex using Oligofectamine reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), excepted for H810

cells transfected with Hi-Perfect reagent (Qiagen). The cells were analyzed 72 hours post-transfection.

### **Quantitative RT-PCR and RT-PCR analyses**

Quantitative RT-PCR was performed on Stratagene MX3005P apparatus (Agilent Technologies), as previously described (Van Den Broeck et al., 2008). The specific primers used for mRNA amplification were as follows: *sc35* forward: 5'-CCA-CTC-AGA-GCT-ATG-AGC-TAC-G-3'; *sc35* reverse: 5'-ACT-CCT-TGG-TGT-AGC-GAT-CC-3'; *Tip60* forward: 5'-AGG-GCA-CCA-TCT-CCT-TCT-TT-3'; *Tip60* reverse: 5'-GTT-AGG-ATG-CAG-GCC-ACA-TT-3'; *GAPDH* forward: 5'-CGA-GAT-CCC-TCC-AAA-ATC-AA-3'; *GAPDH* reverse: 5'-ATC-CAC-AGT-CTT-CTG-GGT-GG-3'. RT-PCR analysis of caspase-8 splice variants was performed as described previously (Merdzhanova et al., 2008).

## **Results**

### **SC35 is acetylated on its Lysine 52 residue by the histone acetyltransferase Tip60**

It is now well-known that lysine acetylation controls expression and functions of non-histone proteins. To test whether SC35 could be acetylated, we transfected SAOS2 cells with an expression vector encoding HA-tagged SC35 protein and used anti-HA antibody to immunoprecipitate SC35 which acetylated status was analyzed by western blotting using an anti-acetyl-lysine antibody. As shown in Figure 1A, an acetylated form of SC35 was detected in these conditions. To go further, immunoprecipitation with anti-acetyl-lysine antibody was performed in nuclear-enriched extracts from H69 cells that express high levels of SC35, and endogenous SC35 protein was detected by western blotting with an anti-SC35 antibody (Figure 1B). Again, an acetylated form of SC35 was detected in these conditions. Similar results were obtained when immunoprecipitation was performed with anti-SC35 antibody followed by western blotting with an anti-acetyl-lysine antibody (data not shown). Together, these data provide evidence that SC35 is subjected to acetylation. During the course of this study, we obtained data demonstrating that the Tip60 acetyltransferase controls acetylation of non histone proteins in our cellular models (Leduc *et al*, 2006; Van den Broeck *et al*, in prep) and we postulated that SC35 could be a new Tip60 target. To test this hypothesis, an “*in vitro*” acetyltransferase assay was set-up in which various truncated GST-SC35 fusion

proteins were used as putative substrates for the Tip60 acetyltransferase (His-Tip60<sup>212-513</sup>) in the presence of C<sup>14</sup>-Acetyl-CoA (Figure 1C). Of note, truncated fragments of SC35 were used in this assay as full-length recombinant SC35 protein cannot be produced in bacteria. As detected by autoradiography (Figure 1D, upper panel), recombinant Tip60 was able to efficiently acetylate SC35 on its first sixty amino acids (1-60) encompassing the RNA Recognition Motif (RRM). In contrast, no signal was detected with GST-SC35(60-115) or GST-SC35(115-221) truncated proteins (Figure 1D, upper panel). This effect was specific of Tip60 since another acetyltransferase, namely GCN5, was unable to acetylate the GST-SC35(1-60) fragment (Figure 1D, upper panel). In order to confirm these results *in vivo*, Tip60 was knocked-down in H1299 cells and the acetylated status of endogenous SC35 was studied by immunoprecipitation using an anti-acetyl lysine antibody followed by immunoblotting using an anti-SC35 antibody. As shown in Figure 1E, Tip60 neutralization significantly decreases SC35 acetylation in these cells. In addition, when immunoprecipitation experiments were set-up in cells co-transfected with SC35 and Tip60 encoding plasmids, an interaction between both Tip60 and SC35 proteins was depicted (Supplementary Figure S1), indicating that both proteins exist in a complex within these cells. Overall, these results demonstrate that SC35 is a substrate of the acetyltransferase Tip60. SC35(1-60) N-terminal part contains three lysine (K) residues (K17, K36 and K52) (Figure 1F, upper panel). To map the acetylation site(s) targeted by Tip60 on SC35, we produced recombinant mutated GST-SC35(1-60) fusion proteins in which each lysine was substituted by an arginine (R), a non-acetylatable residue. Analysis of the K52R and K17R point mutants indicated that K52 was a prime-candidate site for Tip60-mediated acetylation since autoradiographic signal was dramatically lost when K52 residue was mutated into arginine (Figure 1F, lower panel). Of note, we were not able to produce the GST-SC35(1-60) K36 point mutant in bacterial system, so we cannot exclude the possibility that K36 could be acetylated. Taken together, these results demonstrate that Tip60 acetylates SC35 on its lysine K52 residue.

### **Acetylation by Tip60 controls SC35 protein turn-over**

In order to investigate the biological consequences of Tip60-mediated SC35 acetylation, we knocked-down Tip60 expression by using siRNA in various carcinoma cell lines and monitored the expression level of SC35. Immunoblotting experiments reproducibly demonstrated that SC35 protein level significantly increased when Tip60 was neutralized as compared to control cells (Figure 2A, left panel). This effect was specific of SC35 since

SF2/ASF protein amount was not affected, and occurred at a post-transcriptional level since *sc35* mRNA was not significantly up-regulated under these conditions (Figure 2A, right panel). To confirm these data, we analyzed the expression level of SC35 in cells co-transfected with Tip60 and SC35 encoding plasmids (Figure 2B). In agreement with Tip60 being a negative regulator of SC35, SC35 protein level decreased upon Tip60 overexpression (Figure 2B). Treating cells with the proteasomal inhibitor MG132 prevented SC35 downregulation (Figure 2B), thereby indicating that SC35 could be subjected to Tip60-mediated proteasomal degradation. Moreover, a mutant Tip60 with a defective HAT activity (Tip60<sup>G380</sup>) failed to decrease SC35 protein level as compared to wild-type (WT) Tip60 (Figure 2C), supporting the fact that Tip60-mediated SC35 acetylation could be important for SC35 turn-over. To test this hypothesis, we generated an expression vector encoding a HA-tagged SC35(K52R) mutant protein harbouring a K52R substitution, thereby mimicking a non Tip60-acetylatable form of SC35. In co-transfection experiments, Tip60 was unable to decrease the level of this SC35 mutant whereas it significantly down-regulated that of wild-type SC35 (Figure 2D). To confirm the role of the K52 residue on SC35 half-life, H1299 cells were transfected with plasmid encoding either HA-tagged wild-type (WT) or mutant (K52R) SC35 protein and incubated with cycloheximide (CHX), a widely used inhibitor of translation. The amount of HA-SC35 WT or HA-SC35 (K52R) protein was then analyzed by immunoblotting, different times after cycloheximide addition. As depicted in Figure 2E, the mutant SC35(K52R) half-life was strongly enhanced as compared to that of wild-type SC35. Overall, these results demonstrate that acetylation of SC35 by Tip60 negatively controls SC35 protein level by a mechanism involving the proteasome pathway.

### **The deacetylase HDAC6 positively controls SC35 protein level**

Lysine acetylation is finely regulated by the equilibrium between acetyltransferase and deacetylase activities. Among histone deacetylases, HDAC6 is unique as it possesses intrinsic ubiquitin-linked functions in addition to its deacetylase activity (Seigneurin-Berny *et al*, 2001; Boyault *et al*, 2006) and has been reported to protect ubiquitinated proteins from subsequent processing by the proteasome (Boyault *et al*, 2006; Boyault *et al*, 2007a). Having demonstrated that acetylation controls SC35 protein turn-over via a proteasome-dependent mechanism, we investigated the role of HDAC6 in this setting. To do so, HA-tagged SC35 was expressed in H1299 cells in the presence or absence of HDAC6. As shown in Figure 3A, overexpressing HDAC6 induced a strong accumulation of SC35 protein without affecting its

mRNA level (Supplementary Figure S2A). Conversely, neutralizing HDAC6 by using siRNA significantly decreased SC35 protein expression, but not *sc35* mRNA or SF2/ASF protein level (Figure 3B and data not shown). Overall, these data indicated that HDAC6 positively controls SC35 expression level. In addition, when immunoprecipitation experiments were performed in cells co-transfected with plasmids encoding HDAC6 or SC35, both proteins were found to co-immunoprecipitate (Supplementary Figure S2B). In order to investigate the role of lysine K52, immunoprecipitation experiments of acetylated SC35 followed by immunoblotting directed against SC35 were carried-out in cells deprived of HDAC6 by using an anti-Ac-K52 SC35 antibody recognizing SC35 acetylated onto K52 (Supplementary Figure S3). The results showed that knocking-down HDAC6 induced the accumulation of an acetylated form of SC35 (Figure 3C, upper panel). Moreover, in co-transfection experiments, HDAC6 was unable to stabilize the mutant SC35(K52R) as compared to the wild-type SC35 protein (Figure 3C, lower panel). Together, these results indicate that HDAC6 targets lysine K52 to control SC35 protein expression. To extend these data, we took advantage of 3T3 cell lines previously established from mouse embryo fibroblasts isolated from parental (WT) or HDAC6-deficient (KO) mice in which wild-type HDAC6 was re-expressed (+WT) (Boyault *et al.*, 2007a), and analyzed expression of murine SC35 by immunoblotting. As expected from the above data, SC35 protein level was significantly decreased in HDAC6<sup>-/-</sup> 3T3 as compared to parental cells, and reintroduction of wild-type HDAC6 in knock-out cells restored the basal level of SC35 protein (Figure 3D). HDAC6 is a unique class II deacetylase which contains two catalytic domains, and a C-terminal zinc finger domain (ZnF-UBP) that binds with high-affinity free ubiquitin as well as mono- and polyubiquitinated proteins (Boyault *et al.*, 2007). In order to characterize the functional domains of HDAC6 involved in SC35 regulation, we monitored the expression of SC35 in 3T3 cells derived from HDAC6-deficient mice re-expressing either the wild-type HDAC6 (+WT), the HDAC6 mutant deprived of deacetylase activity (+HD<sup>m</sup>), or the HDAC6 mutant deprived of ubiquitin binding function (+Ub<sup>m</sup>). The results showed that both mutants were unable to rescue the down-regulation of SC35 upon HDAC6 loss as compared to wild-type HDAC6 (Figure 3E, upper panel). In addition, treating these cells with MG132 induced SC35 accumulation only in cells expressing wild-type HDAC6 (+WT) (Figure 3E, lower panel). Therefore, these results demonstrate that the catalytic and ubiquitin-binding domains of HDAC6 are both absolutely required for SC35 protein accumulation. Finally, as the ratio between Tip60 and HDAC6 proteins could be a determinant of SC35 expression, we performed co-transfection experiments in which



increasing amounts of HDAC6 were produced in the presence of high levels of Tip60. As shown in Figure 3F, HDAC6 thoroughly reversed Tip60-mediated down-regulation of SC35, even at a low level, indicating that HDAC6 activity outweighs the negative regulation of SC35 imposed by Tip60. As a whole, our data demonstrate that HDAC6 plays a key role in the maintenance of SC35 protein level by inhibiting Tip60-mediated acetylation and proteasomal degradation. These results indicate that an acetylation/deacetylation switch controls SC35 protein turn-over.

### **Tip60 inhibits SC35 phosphorylation by preventing SRPK1 and SRPK2 nuclear translocation**

Numerous studies have now identified crossregulations between lysine acetylation and others post-translational modifications, such as phosphorylation (Yang and Seto, 2008). As phosphorylation is a critical regulator of SR proteins activity, we then asked whether acetylation could affect the phosphorylation of SC35. To explore this possibility, we first analyzed the phosphorylation level of SC35 in cells transfected with a plasmid encoding Tip60-HA, in the presence of MG132 to prevent SC35 proteasomal degradation. Overexpression of Tip60 significantly attenuated SC35 phosphorylation, as seen by western blotting using two different antibodies recognizing phosphorylated forms of SC35 (Figure 4A). The effect of Tip60 required its HAT activity since SC35 phosphorylation was apparently not affected by mutant Tip60<sup>G380</sup> (Figure 4A). Conversely, SC35 phosphorylation was enhanced when Tip60 was neutralized by siRNA (Figure 4B). Altogether, these data indicate that Tip60 negatively controls SC35 phosphorylation and suggest a dialogue between acetylation and phosphorylation networks to control SC35 protein activity. Among the growing list of SR protein kinases, the SRPK family that includes SRPK1 and SRPK2 is well-characterized. We provided evidence that down-regulation of either SRPK1 or SRPK2 protein using specific siRNAs attenuated SC35 phosphorylation (Supplementary Figure S4), indicating that these kinases largely contribute to SC35 phosphorylation in our cellular models. Therefore, to test whether Tip60 could prevent SC35 phosphorylation by altering the expression level of SRPK(s), we performed immunoblotting experiments using whole-cell extracts of cells in which Tip60 expression was either upregulated or knocked-down. As shown in Figure 4C (upper panel) and Figure 4D (upper panel), overexpression or neutralization of Tip60 did not significantly modify the total amount of SRPK1 or SRPK2 protein. SRPK1 and SRPK2 kinases are proteins that shuttle between the cytoplasm and the

nucleus (Ding et al., 2006). So, we next tested whether Tip60 could alter SRPK(s) sub-cellular distribution. To this purpose, cellular fractionation experiments were set-up in cells transfected with either Tip60 encoding plasmid or *Tip60* siRNA, and SRPK protein levels were analyzed by immunoblotting in nuclear or cytoplasmic fractions. A significant decrease of nuclear SRPK(s) correlated with a decreased level of nuclear P-SC35 protein was observed upon Tip60 overexpression as compared to control cells (Figure 4C, lower panel). By contrast, strong nuclear accumulation of SRPK(s) associated with P-SC35 increase was observed in cells knocked-down for Tip60 as compared to *mismatch* transfected cells (Figure 4D, lower panel). Altogether, these results indicate that Tip60 negatively controls SC35 phosphorylation by preventing nuclear accumulation of SRPK kinases. Of note, we also investigated the role of HDAC6 in this setting. HDAC6 neither affected SC35 phosphorylation status, nor modified SRPK(s) protein levels or sub-cellular localization in our cellular models (data not shown).

### **SC35 accumulates in a hypoacetylated and phosphorylated form in response to cisplatin treatment**

We next attempted to characterize in which physiological context the signaling networks involving Tip60, HDAC6 and SRPK(s) proteins controlled SC35 protein status. We recently demonstrated that SC35 is upregulated and required for the apoptotic response induced by alkylating agents (Merdzhanova et al., 2008). In this study, we provided evidence that SC35 also accumulates in cells treated with cisplatin (Figure 5A, left panel). RT-QPCR experiments failed to detect an increase of *sc35* mRNA level in treated cells (data not shown), indicating that accumulation of SC35 protein in response to cisplatin is mainly a post-transcriptional event. In agreement with our previous results (Merdzhanova et al., 2008), inhibition of SC35 expression strongly impaired the occurrence of apoptosis induced by cisplatin, as measured by caspase-3 activation using western blotting (Figure 5A, left panel) or flow cytometry (Figure 5A, right panel, black bars). It also modulated the ratio between the pro-apoptotic *caspase-8a* and anti-apoptotic *caspase-8L* splice variants (Himeji et al., 2002) in favor of the anti-apoptotic one (Figure 5B). Taken together, these results indicate that SC35 accumulates upon cisplatin treatment and contributes to cisplatin-induced apoptosis. In order to assess whether acetylation/phosphorylation signaling networks could play a role in this context, we first analyzed the acetylated status of SC35. Immunoprecipitation experiments demonstrated that SC35 acetylation was dramatically lost upon cisplatin treatment (Figure 5C). This effect was

specific of SC35 since cisplatin strongly stimulated the acetylation of the transcription factor E2F1, in agreement with previous data (Ianari et al., 2004). Consistent with the loss of SC35 acetylation, immunoblotting and RT-QPCR experiments demonstrated that cisplatin induced a significant decrease of both Tip60 mRNA and protein levels as compared to untreated cells, which correlated with the occurrence of apoptosis as detected by caspase-3 activation (Figure 5D). These results were also confirmed in others cell lines (data not shown). Interestingly, while expression of HDCA6 protein did not significantly vary in cisplatin-treated cells, its neutralization decreased the accumulation of SC35 (Figure 5E), indicating that HDAC6 is required for SC35 increase in that case. Concomitant with the loss of SC35 acetylation, increased levels of phosphorylated SC35 protein (P-SC35) were detected in response to cisplatin (Figure 5F) and were associated with the nuclear accumulation of both SRPK1 and SRPK2 kinases (Figure 5G). Overall, these results demonstrate that SC35 accumulates in a hypoacetylated and phosphorylated form in cisplatin-treated cells.

### **SRPK1 and SRPK2 differentially control SC35 phosphorylation and cell fate in response to cisplatin**

It has been proposed that SRPK1 and SRPK2 kinases have both overlapping and unique functions in mammalian cells (Mathew et al., 2008). Finally, we investigated the role of each SRPK in cisplatin-induced SC35 phosphorylation and apoptosis. To this purpose, H358 (Figure 6) and H1299 (data not shown) cells were transfected with siRNA targeting either *SRPK1* or *SRPK2* and were subjected or not to cisplatin exposure for 24 hours. We observed that neutralization of SRPK2 significantly prevented the phosphorylation of SC35 (Figure 6A, left panel) and the induction of apoptosis following cisplatin treatment (Figure 6A, left and right panels). Of note, and as shown by western blotting (Figure 6A, left panel), exposure to cisplatin led to the appearance of a cleaved product of SRPK2 that has been previously described in apoptotic cells (Kamachi et al., 2002). In addition, and consistent with apoptosis measurements, the knockdown of SRPK2 strongly increased the *caspase-8L/caspase-8a* ratio in cisplatin-treated cells (Figure 6B). Similar results were obtained in H1299 cells (data not shown). Altogether, these results demonstrate that SRPK2 is a critical regulator of SC35 during cisplatin-induced apoptosis. By contrast, the neutralization of SRPK1 did not prevent the accumulation of P-SC35, and apoptosis sharply increased as detected by western blot (Figure 6A, left panel) or flow cytometry (Figure 6A, right panel). These data indicate that SRPK1 inhibits rather than stimulates cisplatin-induced apoptosis. Therefore it appears that

SRPK1 and SRPK2 kinases do not play the same role in response to cisplatin. Finally, as apoptosis was impaired in SRPK2-depleted cells upon drug treatment, we wondered about the fate of these cells. To answer, the cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. As depicted in Figure 6C, while appearance of apoptotic cells with a sub-G<sub>1</sub> DNA content was observed after cisplatin exposure, inhibiting SRPK2 expression in these conditions induced a G<sub>2</sub>/M arrest. Overall, these data indicate that SRPK-regulated SC35 phosphorylation controls cell fate decision in response to cisplatin treatment.

## Discussion

A high-resolution mass spectrometry analysis recently identified 3600 lysine acetylation sites on 1750 proteins (Choudhary et al., 2009). Interestingly, when these proteins were classified according to their cellular functions, two classes emerged: the first one bringing together cell cycle regulators and the second one, RNA splicing components. Moreover, when architecture of acetylated proteins was analyzed, RNA recognition motif (RRM) domains were overrepresented in the lysine acetylome, strongly supporting a role of this post-translational modification in the control of pre-mRNA processing events. In this study, we unravel the first acetylation/phosphorylation signaling network regulating the turn-over and activity of a key splicing regulator, namely the SR protein SC35. In this setting, we identify a closed interplay between SC35, the Tip60 acetyltransferase, the HDAC6 deacetylase and the SRPK1 and SRPK2 kinases. Therefore, besides phosphorylation, we characterize lysine acetylation as a new post-translational modification of SR proteins, which role as a regulator of pre-mRNA splicing events has now to be fully considered.

Only a few data exist about the molecular mechanisms regulating SC35 protein expression. It is known that, when highly expressed, SC35 negatively controls its own expression, through activation of alternative splicing events leading to the generation of distinct splice variants that are targeted by the non-sense-mediated mRNA decay machinery (Sureau et al., 2001). In addition, we recently demonstrated that E2F1 is a direct transcriptional factor towards SC35 promoter (Merdzhanova et al., 2008), thereby identifying an upstream activator of SC35. In this study, by demonstrating that Tip60 acetylates SC35 on its lysine 52 (K52) residue and promotes its proteasomal degradation, we characterize a novel mechanism that controls SC35

protein level. It has been previously described that SC35 partially colocalizes with 20S proteasomes and accumulates under treatment with the proteasome inhibitor lactacystin (Dino Rockel and von Mikecz, 2002). Moreover, another SR protein, namely SRp55, has been reported to be targeted by the proteasome (Lai et al., 2003). Therefore, these and our data suggest that proteasome-dependent proteolysis could be a general mechanism to control SR proteins turn-over. Most of the examples described in the literature designate lysine acetylation as a stabilizing post-translational modification, through a blocking effect which hinders lysine ubiquitination (Sadoul et al., 2008). In contrast and consistent with our results, lysine acetylation has also been reported as a signal enhancing protein degradation (Caron et al., 2005; Leduc et al., 2006; Sadoul et al., 2008). We do not elucidate here the molecular mechanisms by which Tip60 targets SC35 to proteasomal degradation, but it has been previously shown that Tip60 can interact with some E3-ubiquitin ligases such as MDM2 (Legube et al., 2002) or Pirh2 (Logan et al., 2004). It is thus tempting to speculate that Tip60 acts as an adaptor to allow the recruitment and to stimulate the activity of specific ubiquitin ligase complex towards SC35. Importantly, we also demonstrate that the deacetylase HDAC6 interacts with and stabilizes SC35 by a mechanism that requires its deacetylase domain, and we further show that lysine 52 is a critical residue in this process. These results suggest that deacetylation of SC35 by HDAC6 could prevent its further ubiquitination and degradation. It is also known that high-affinity binding of HDAC6 to ubiquitin prevents the access of other cellular factors to poly-ubiquitin chains, thereby protecting ubiquitinated proteins from proteasomal degradation (Boyault et al., 2007). Since we demonstrate that ubiquitin-binding domain of HDAC6 is also required for SC35 accumulation, our results additionally suggest that HDAC6 could bind an acetylated and ubiquitinated form of SC35 and prevent its further degradation. These results could explain why SC35 still accumulates in cells overexpressing Tip60 in the presence of high amounts of HDAC6 (Figure 3F) and support an hypothetic model in which the equilibrium between Tip60 and HDAC6 activities controls SC35 protein turn-over (Figure 7A). Further experiments are now needed to thoroughly examine the relationship between SC35 and the components of the ubiquitination machinery.

Phosphorylation of SR proteins is essential for their nuclear import and is required for initiation of spliceosome assembly (Cao et al., 1997; Xiao and Manley, 1997). Conversely, dephosphorylation of SR proteins is critical for splicing catalysis once the spliceosome is assembled (Cao et al., 1997; Mermoud et al., 1992) and for several post-splicing events

(Sanford et al., 2005). Therefore, phosphorylation of SR proteins must be tightly regulated. Several SR protein kinases have been identified to date. The SRPK1 and SRPK2 kinases are among the best-characterized ones. They are detected in both the cytoplasm and the nucleus (Ding et al., 2006; Wang et al., 1998), and play an important role in nuclear import as well as in intranuclear localization of SR proteins (Gui et al., 1994; Yeakley et al., 1999). SRPKs are major kinases for SR proteins in mammalian cells (Hayes et al., 2006). Consistently, we provide evidence that both SRPK1 and SRPK2 proteins mainly contribute to SC35 phosphorylation in our cellular models. Moreover, we demonstrate that Tip60 decreases the phosphorylation of SC35 by a mechanism requiring its HAT activity, unraveling a close interplay between acetylation and phosphorylation signaling pathways. It has been recently proposed that, in the same way that phosphorylation affects acetylation of a neighboring lysine, acetylation might also regulate phosphorylation of adjacent or distant residues (Yang and Seto, 2008). In addition recent studies have shown that while recognition of the RS domain of SF2/ASF by a docking groove on SRPK1 is sufficient to initiate processive and directional phosphorylation, continued phosphorylation relies on the fine-tuning of contacts with RRM modules (Hagopian et al., 2008; Ngo et al., 2008). Based on these data, it might be speculated that acetylation of SC35 inside its RRM by Tip60 could interfere with SRPK-mediated phosphorylation. However, as HDAC6 as well as the mutation of lysine 52 into a non-acetylatable residue did not modify SC35 phosphorylation (Edmond, unpublished results), these data indicate that the inhibition of SC35 phosphorylation by Tip60 could involve another mechanism. Indeed, we provide further evidence that Tip60 inhibits the nuclear translocation of SRPK1 and SRPK2, thereby indicating that the inappropriate cellular distribution of SRPKs upon Tip60 expression might mainly contribute to its negative effect on SC35 phosphorylation. It has been shown that the spacer sequence that splits the conserved kinases domains of SRPK1 and SRPK2 into two blocks is involved in their partitioning between the cytoplasm and the nucleus (Ding et al., 2006). Whether Tip60 is able to target directly or indirectly this accessory domain to affect SRPKs nuclear accumulation remains to be determined. Of note, SRPK1 was identified as a putative acetylated protein by Choudhary and colleagues (Choudhary et al., 2009), thereby suggesting that Tip60 could directly target it.

In agreement with an important role of SC35 during DNA Damage Response (DDR) (Merdzhanova et al., 2008), we finally demonstrate that SC35 is upregulated and required for cellular apoptosis in response to cisplatin treatment. Importantly we show that, in this context,

SC35 accumulates in a phosphorylated/hypoacetylated form. Such post-translational modifications of SC35 are accompanied by a strong decrease of Tip60 mRNA and protein expression, as well as with the nuclear accumulation of both SRPK1 and SRPK2 kinases. The crucial role of Tip60 during DDR is now emerging (Squatrito et al., 2006) and high amounts of Tip60 protein have been correlated with cisplatin resistance in several human lung carcinoma cell lines (Miyamoto et al., 2008). Therefore, our results are consistent with a model in which cisplatin-induced apoptosis involves Tip60 downregulation, SC35 stabilization and SC35 phosphorylation (Figure 7B). In addition, as HDAC6 is required for SC35 stabilization (Figure 5E) as well as for apoptosis occurrence (data not shown) in this context, the Tip60/HDAC6 ratio would play a key role in the control of SC35 expression in response to cisplatin. Importantly, we also demonstrate that SRPK2 is absolutely required for SC35 phosphorylation and determines cell fate (growth arrest versus apoptosis). In contrast, SRPK1 appears to have opposite functions since its neutralization increases rather than inhibits apoptosis. Of note, such a role of SRPK1 in resistance to cisplatin has been previously reported in pancreatic carcinoma (Hayes et al., 2006; Hayes et al., 2007). Therefore, and as recently suggested (Mathew et al., 2008), our data provide further evidence that each SRPK have both overlapping and independent functions. Furthermore, they support a critical role of SRPK2-mediated SC35 phosphorylation in the induction of apoptosis following cisplatin treatment.

To conclude, our study highlights a new acetylation/phosphorylation signaling network targeting the SC35 protein, to control cellular apoptosis in response to genotoxic stress. These data reinforce the connection between chromatin and splicing players, and open the way to further experiments aiming at thoroughly examine the role of such connection in the control of pre-mRNA splicing events.

## **Acknowledgements**

We thank Patricia Betton, Pascal Perron and Celine Barrial-Lampreia for technical assistance. This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée Ligue 2007) and by the Conseil Scientifique National d'AGIR à dom. Valerie Edmond was supported by a grant from the Conseil Scientifique National d'AGIR à dom.

## References

- Batsche, E., Yaniv, M. and Muchardt, C. (2006) The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 22-29.
- Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M. and Khochbin, S. (2007) HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*, **26**, 5468-5476.
- Cao, W., Jamison, S.F. and Garcia-Blanco, M.A. (1997) Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA*, **3**, 1456-1467.
- Caron, C., Boyault, C. and Khochbin, S. (2005) Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioessays*, **27**, 408-415.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V. and Mann, M. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, **325**, 834-840.
- Ding, J.H., Zhong, X.Y., Hagopian, J.C., Cruz, M.M., Ghosh, G., Feramisco, J., Adams, J.A. and Fu, X.D. (2006) Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **17**, 876-885.
- Dino Rockel, T. and von Mikecz, A. (2002) Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization. *J Struct Biol*, **140**, 189-199.
- Graveley, B.R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna*, **6**, 1197-1211.
- Gui, J.F., Lane, W.S. and Fu, X.D. (1994) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*, **369**, 678-682.
- Hagopian, J.C., Ma, C.T., Meade, B.R., Albuquerque, C.P., Ngo, J.C., Ghosh, G., Jennings, P.A., Fu, X.D. and Adams, J.A. (2008) Adaptable molecular interactions guide phosphorylation of the SR protein ASF/SF2 by SRPK1. *J Mol Biol*, **382**, 894-909.
- Hayes, G.M., Carrigan, P.E., Beck, A.M. and Miller, L.J. (2006) Targeting the RNA splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, **66**, 3819-3827.
- Hayes, G.M., Carrigan, P.E. and Miller, L.J. (2007) Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer Res*, **67**, 2072-2080.
- Himeji, D., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., Hayashi, K., Watanabe, T. and Harada, M. (2002) Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood*, **99**, 4070-4078.
- Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E. and Gulino, A. (2004) Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J Biol Chem*, **279**, 30830-30835.
- Johnson, J.M., Castle, J., Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P.M., Armour, C.D., Santos, R., Schadt, E.E., Stoughton, R. and Shoemaker, D.D. (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*, **302**, 2141-2144.
- Kamachi, M., Le, T.M., Kim, S.J., Geiger, M.E., Anderson, P. and Utz, P.J. (2002) Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *J Exp Med*, **196**, 1213-1225.



- Lai, M.C., Lin, R.I. and Tarn, W.Y. (2003) Differential effects of hyperphosphorylation on splicing factor SRp55. *Biochem J*, **371**, 937-945.
- Leduc, C., Claverie, P., Eymin, B., Col, E., Khochbin, S., Brambilla, E. and Gazzeri, S. (2006) p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene*, **25**, 4147-4154.
- Legube, G., Linares, L.K., Lemercier, C., Scheffner, M., Khochbin, S. and Trouche, D. (2002) Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation. *EMBO J*, **21**, 1704-1712.
- Liu, H.X., Zhang, M. and Krainer, A.R. (1998) Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev*, **12**, 1998-2012.
- Logan, I.R., Sapountzi, V., Gaughan, L., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2004) Control of human PIRH2 protein stability: involvement of TIP60 and the proteasome. *J Biol Chem*, **279**, 11696-11704.
- Loomis, R.J., Naoe, Y., Parker, J.B., Savic, V., Bozovsky, M.R., Macfarlan, T., Manley, J.L. and Chakravarti, D. (2009) Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation. *Mol Cell*, **33**, 450-461.
- Mathew, R., Hartmuth, K., Mohlmann, S., Urlaub, H., Ficner, R. and Luhrmann, R. (2008) Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 435-443.
- Merdzhanova, G., Edmond, V., De Seranno, S., Van den Broeck, A., Corcos, L., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S. and Eymin, B. (2008) E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ*.
- Mermoud, J.E., Cohen, P. and Lamond, A.I. (1992) Ser/Thr-specific protein phosphatases are required for both catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res*, **20**, 5263-5269.
- Miyamoto, N., Izumi, H., Noguchi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Shiota, M., Kidani, A., Tawara, A. and Kohno, K. (2008) Tip60 is regulated by circadian transcription factor clock and is involved in cisplatin resistance. *J Biol Chem*, **283**, 18218-18226.
- Ngo, J.C., Giang, K., Chakrabarti, S., Ma, C.T., Huynh, N., Hagopian, J.C., Dorrestein, P.C., Fu, X.D., Adams, J.A. and Ghosh, G. (2008) A sliding docking interaction is essential for sequential and processive phosphorylation of an SR protein by SRPK1. *Mol Cell*, **29**, 563-576.
- Sadoul, K., Boyault, C., Pabion, M. and Khochbin, S. (2008) Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie*, **90**, 306-312.
- Salon, C., Eymin, B., Micheau, O., Chaperot, L., Plumas, J., Brambilla, C., Brambilla, E. and Gazzeri, S. (2006) E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ*, **13**, 260-272.
- Salon, C., Merdzhanova, G., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S. and Eymin, B. (2007) E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors. *Oncogene*.
- Sanford, J.R., Ellis, J. and Caceres, J.F. (2005) Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing. *Biochem Soc Trans*, **33**, 443-446.
- Schwartz, S., Meshorer, E. and Ast, G. (2009) Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 990-995.
- Sims, R.J., 3rd, Millhouse, S., Chen, C.F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L. and Reinberg, D. (2007) Recognition of trimethylated histone H3 lysine

- 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, **28**, 665-676.
- Squatrito, M., Gorrini, C. and Amati, B. (2006) Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol*, **16**, 433-442.
- Stamm, S. (2008) Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem*, **283**, 1223-1227.
- Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stevenin, J. and Soret, J. (2001) SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *Embo J*, **20**, 1785-1796.
- Tilgner, H., Nikolaou, C., Althammer, S., Sammeth, M., Beato, M., Valcarcel, J. and Guigo, R. (2009) Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 996-1001.
- Van Den Broeck, A., Brambilla, E., Moro-Sibilot, D., Lantuejoul, S., Brambilla, C., Eymin, B., Khochbin, S. and Gazzeri, S. (2008) Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, **14**, 7237-7245.
- Wang, H.Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C. and Fu, X.D. (1998) SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol*, **140**, 737-750.
- Wu, J.Y. and Maniatis, T. (1993) Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell*, **75**, 1061-1070.
- Xiao, S.H. and Manley, J.L. (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev*, **11**, 334-344.
- Yang, X.J. and Seto, E. (2008) Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*, **31**, 449-461.
- Yeakley, J.M., Tronchere, H., Olesen, J., Dyck, J.A., Wang, H.Y. and Fu, X.D. (1999) Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol*, **145**, 447-455.

## Figure legends

**Figure 1: SC35 is acetylated on its lysine 52 (K52) residue by Tip60.** (A) SAOS2 cells were transfected for 48 h with a HA-tagged SC35 expression vector. Whole-cellular extracts were subjected to immunoprecipitation with either anti-HA antibody or irrelevant immunoglobulin (IgG) as a negative control, followed by immunoblotting with anti-acetyl-lysine antibody (Ac-K). The Ac-K blot was stripped and re-probed with anti-HA antibody to confirm the presence of an overlapping transfected SC35-HA band. (B) Endogenous acetylated SC35 protein was detected from H69 nuclear-enriched extract after immunoprecipitation of acetylated proteins with an anti-acetyl-lysine antibody and immunodetection using an anti-SC35 antibody. (C) Schematic representation of recombinant

truncated GST-SC35 fusion proteins and recombinant His-tagged Tip60<sup>212-513</sup> and GCN5 acetyltransferases used in the following assays. **(D)** Purified GST-SC35 fusion proteins were incubated with recombinant His-tagged Tip60<sup>212-513</sup> or hGCN5 in the presence of [<sup>14</sup>C]acetyl-CoA. Acetylation was revealed after autoradiography (upper panel). Equivalent amounts of various GST-SC35 truncated recombinant proteins were assessed by Coomassie staining (lower panel). **(E)** H1299 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *Tip60* siRNAs and treated for 18 additional hours with MG132. Total cellular extracts were subjected to immunoprecipitation with an anti-Ac-K antibody followed by immunoblotting with anti-SC35 antibody (upper panel). Neutralization of Tip60 was controlled by RT-QPCR (lower panel). **(F)** Schematic representation of the recombinant SC35 (1-60) fragment. The three lysine residues are mentioned (upper panel). GST-SC35 (1-60) wild-type (WT) or point mutants recombinant proteins were incubated with [<sup>14</sup>C]acetyl-CoA in the presence (+) or absence (-) of recombinant His-tagged Tip60<sup>212-513</sup>. Analysis of SC35 acetylation was performed as in **D**. K17R and K52R represent the substitution of the indicated lysine by arginine (lower panel).

**Figure 2: Acetylation by Tip60 controls SC35 turn-over.** **(A)** H358 and H1299 cell lines were transfected for 72 h with *mismatch* or *Tip60* siRNAs. SC35 and SF2/ASF protein levels were analyzed by western blotting. Actin was used as a loading control (left panel). *SC35* and *Tip60* transcripts were quantified by RT-QPCR (right panel). **(B)** H1299 cells were transfected for 48 h with HA-tagged SC35 encoding plasmid, in the presence or absence of a HA-tagged Tip60 expression vector. Cells were treated (+) or not (-) for 18 h with the proteasome inhibitor MG132. Whole cellular extracts were subjected to western blot analysis using anti-HA antibody. **(C)** HA-tagged SC35 protein was co-expressed in H1299 cells with either wild-type (WT) HA-Tip60 or mutant (G380) HA-Tip60<sup>G380</sup> with impaired HAT domain. Forty-eight hours later, SC35 and Tip60 protein levels were analyzed by western blotting using anti-HA antibody. **(D)** H1299 cells were transfected for 48 h with plasmid encoding either wild type (WT) or lysine 52 mutant (K52R) HA-tagged SC35 protein, in the presence (+) or absence (-) of HA-tagged Tip60. SC35 and Tip60 proteins were detected by western blotting using anti-HA antibody (left panel). SC35 and actin signal intensities were quantified using the ImageJ software and the relative densitometric areas for SC35 or SC35(K52R) were determined according to actin signal in each condition (right panel). **(E)** H1299 cells were transfected for 48 h with HA-SC35 WT or K52R expression vector then

treated with cycloheximide (CHX) for the indicated times. Whole cellular extracts were subjected to western blotting using anti-HA antibody. Actin was used as a loading control (left panel). SC35 densitometric signals were normalized to actin. A value of 1 was arbitrarily assigned to the signal obtained at zero time of CHX treatment (right panel).

**Figure 3: HDAC6 acts as a positive regulator of SC35 protein level by counteracting Tip60-mediated effects.** (A) H1299 cells were co-transfected for 48 h with HA-tagged SC35 and Flag-tagged HDAC6 expression vectors. SC35 protein level was analyzed by western blotting using an anti-HA antibody. (B) H358 and H810 cells were transfected for 72 h with *mismatch* or *HDAC6* siRNAs. Expression of SC35 and SF2/ASF proteins was studied by western blotting. (C) H810 cells were transfected for 72 h with either *mismatch* or *HDAC6* siRNAs. Total cellular extracts were subjected to immunoprecipitation with anti-Ac-K52 SC35 antibody followed by immunoblotting with anti-SC35 antibody (upper panel). H1299 cells were transfected for 48 h with HA-tagged SC35 WT or K52R expression vector, in the presence (+) or absence (-) of Flag-tagged HDAC6 and subjected to western blot analysis for detection of HA-SC35 expression (lower panel). (D) Whole cellular extracts derived from 3T3 cell lines wild-type (WT), HDAC6<sup>-/-</sup> (KO) or HDAC6<sup>-/-</sup> re-expressing the wild-type HDAC6 (+WT) were used to analyze SC35 protein level.  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. (E) One of the HDAC6-deficient clones was used to establish new lines re-expressing wild-type HDAC6 (+WT) or a catalytically dead (+HD<sup>m</sup>) or a non-ubiquitin-binding mutant of HDAC6 (Ub<sup>m</sup>) (Boyault *et al*, 2007a). Whole cellular extracts were used to study SC35 expression (upper panel). Same cells were treated (+) or not (-) with proteasome inhibitor MG132 for 18 hours and SC35 expression was analyzed by western blot (lower panel). (F) HA-tagged SC35 protein was co-expressed together with HA-tagged Tip60 protein in H1299 cells, in the presence of increasing amount of Flag-tagged HDAC6 expression vector. SC35 protein expression was detected by western blotting using an anti-HA antibody.

**Figure 4: Tip60 down-regulates SC35 phosphorylation by preventing SRPK1/2 nuclear translocation.** (A) H1299 cells were co-transfected for 48 h with HA-tagged SC35 and either HA-Tip60 WT or HA-Tip60<sup>G380</sup> expression vectors and treated for 18 h with MG132 to prevent SC35 proteasomal degradation. SC35 phosphorylation was studied by western blotting using either an antibody raised against a phospho-epitope recognizing all phosphorylated SR proteins (mAb104) or a specific phospho-SC35 (P-SC35) antibody. Actin

was used as a loading control. (B) H358 cells were transfected for 72 h with either *mismatch* or *Tip60* siRNAs. SC35 phosphorylation was studied by western blotting using a specific P-SC35 antibody (upper panel). Neutralization of Tip60 was controlled by RT-QPCR (lower panel). (C) HA-tagged SC35 protein was co-expressed in H1299 cells with HA-tagged Tip60 protein. Total cellular extracts (upper panel) or cytoplasmic (C) and nuclear (N) extracts (lower panel) were subjected to western blot with the indicated antibodies. Quality of fractionation was controlled by immunodetection of the cytoplasmic  $\alpha$ -tubulin or the nuclear histone H3. (D) H810 cells were transfected for 72 h with *mismatch* or *Tip60* siRNAs and total cellular extracts were immunoblotted with anti-SRPK1 or anti-SRPK2 antibody (upper panel). Cytoplasmic (C) and nuclear (N) extracts were subjected to immunoblotting using anti-P-SC35, anti-SRPK1 or anti-SRPK2 antibody. Anti- $\alpha$ -tubulin and anti-histone H3 antibodies were used to assess the fractionation efficiency (lower panel).

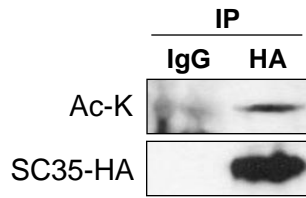
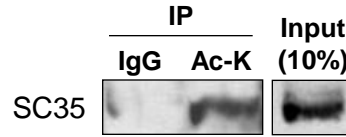
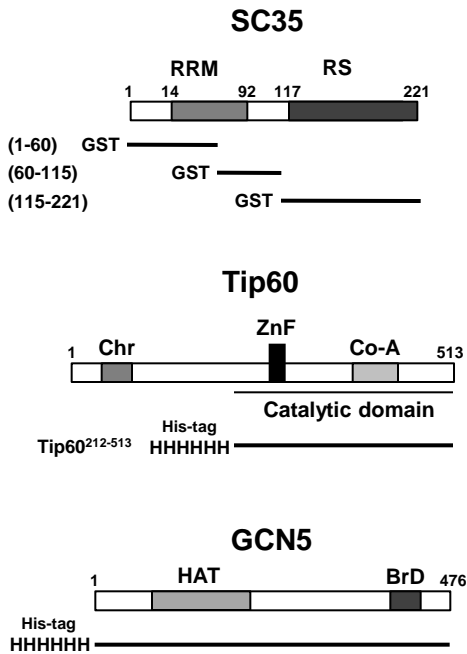
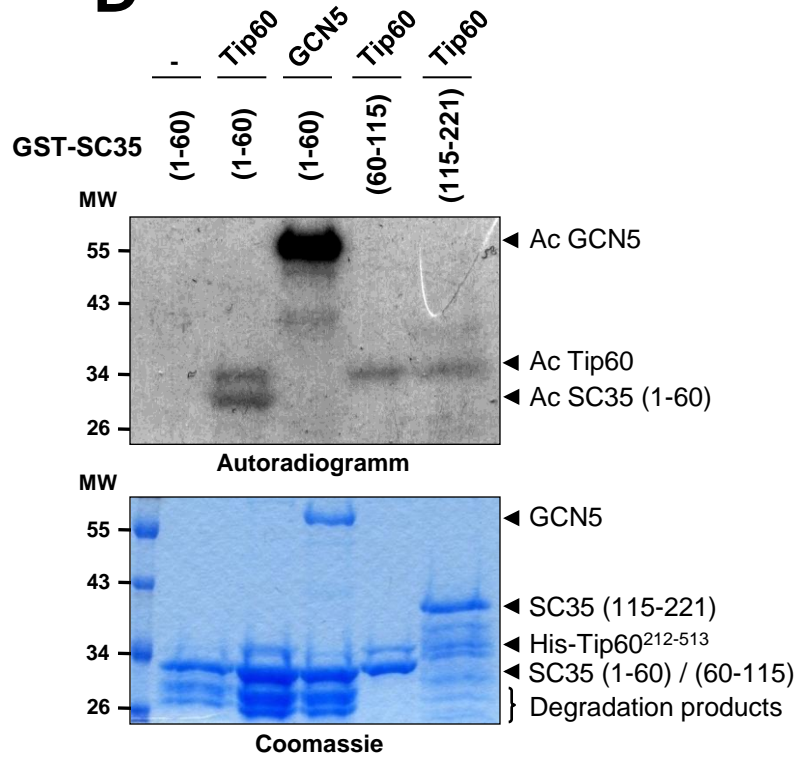
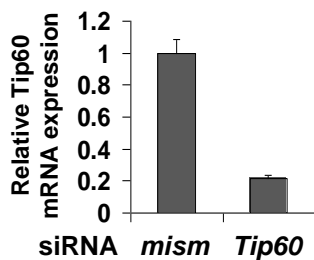
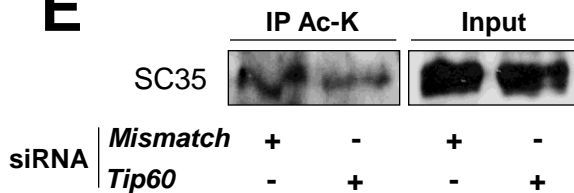
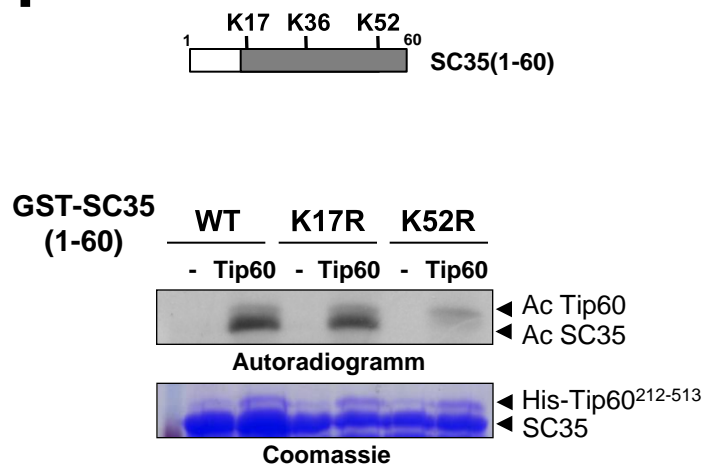
**Figure 5: SC35 accumulates in a hypoacetylated and phosphorylated form in response to cisplatin treatment and is required for apoptosis.** (A, B) H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *SC35* siRNAs and treated (+) or not (-) for 24 additional hours with cisplatin (100  $\mu$ M). (A) Western blot analysis was performed using anti-SC35 or anti-active caspase-3 antibody. Actin was used as loading control (left panel). Apoptosis was quantified by flow cytometry analysis of active caspase-3 in untreated (grey bars) or treated (black bars) cells (right panel). (B) Total RNAs were extracted and subjected to RT-PCR analysis using specific primers of *caspase-8* splice variants. *Caspase-8L* and *caspase-8a* have anti-apoptotic and pro-apoptotic properties, respectively. *Gapdh* was used as an internal control (left panel). Densitometric signals were quantified using the Image J software and the relative ratio caspase-8L/caspase-8a was calculated in either untreated (grey bars) or treated (black bars) cells (right panel). (C) H810 cells were treated or not for 24 h with 100  $\mu$ M cisplatin. Nuclear-enriched extracts were prepared and immunoprecipitation of acetylated proteins was performed using an anti-acetyl lysine antibody followed by immunoblotting using an anti-SC35 antibody to detect endogenous acetylated SC35. The membrane was re-blotted with anti-E2F1 antibody to detect endogenous acetylated E2F1. (D) H810 cells were treated or not for 24 h with 100  $\mu$ M cisplatin and subjected to western blot analysis (left panel) in order to detect SC35, Tip60 and HDAC6 proteins. Cisplatin-induced apoptosis was assessed by detection of active caspase-3 by immunoblotting. Tip60 transcript level was quantified by RT-QPCR (right panel). (E) H358 cells were transfected for 48 h with *mismatch* or *HDAC6*

siRNAs and treated (+) or not (-) for 24 additional hours with 100  $\mu$ M cisplatin. Western blot analysis was performed for the detection of SC35 protein. Efficiency of the knockdown was assessed by immunoblotting using an anti-HDAC6 antibody. (F) Total cellular extracts were obtained from H358 and H1299 cells treated or not for 24 h with 100  $\mu$ M cisplatin. P-SC35 and SC35 protein levels were analyzed by western-blotting. (G) Cytoplasmic and nuclear extracts from H810 cells treated or not for 24 h with 100  $\mu$ M cisplatin were subjected to western blotting using the indicated antibodies.  $\alpha$ -tubulin and histone H3 proteins were detected to verify quality of cell fractionation.

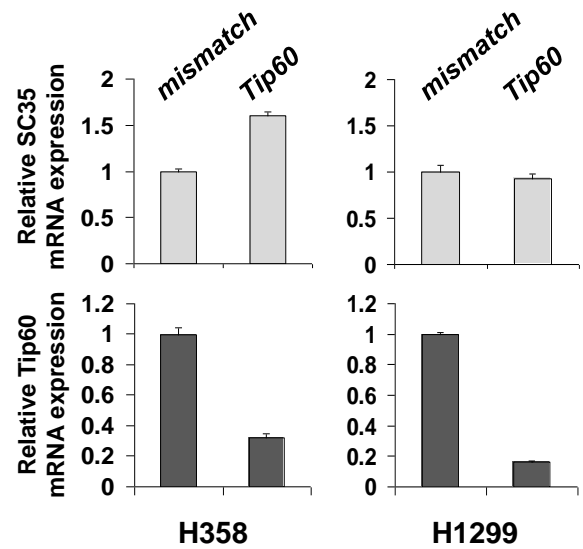
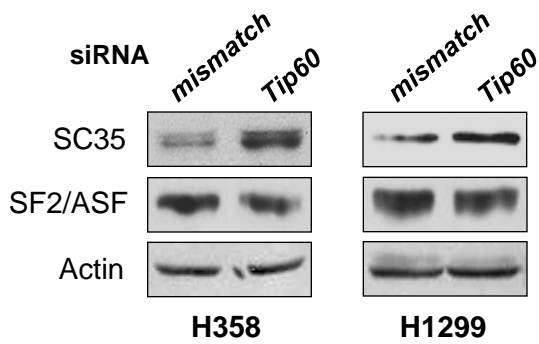
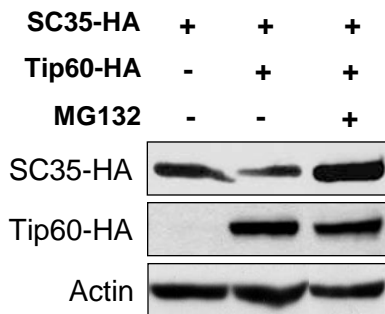
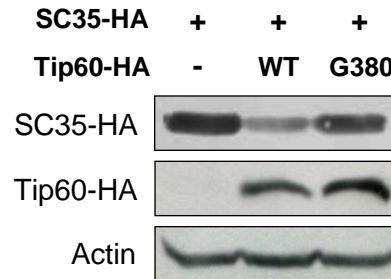
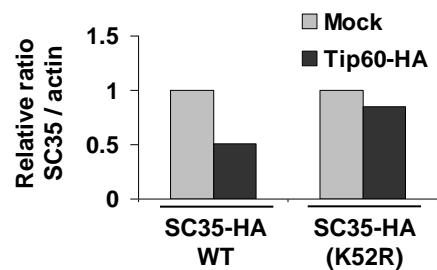
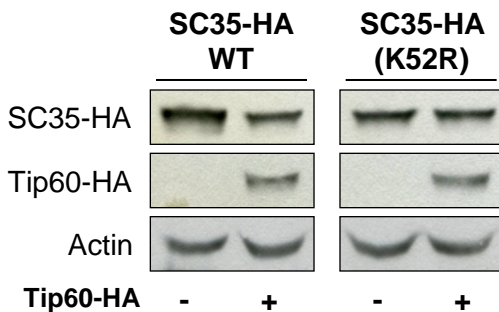
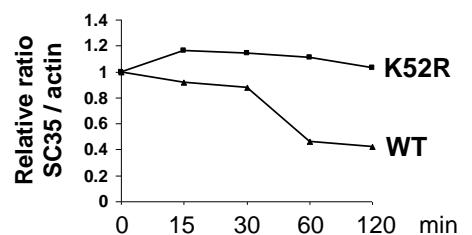
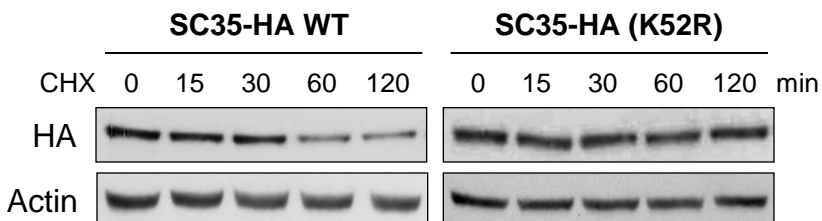
**Figure 6: SRPK2 but not SRPK1 is required for SC35 phosphorylation and apoptosis occurrence in response to cisplatin.** (A, B) H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch*, *SRPK1* or *SRPK2* siRNAs and treated (+) or not (-) for 24 additional hours with 100  $\mu$ M cisplatin. (A) Western blot analyses were performed to detect SC35, P-SC35 and active caspase-3 proteins. Efficiency of the knockdown was verified by immunoblotting using anti-SRPK1 or anti-SRPK2 antibody (left panel). Apoptosis was quantified in untreated (grey bars) or treated (black bars) cells by analysis of caspase-3 activation by flow cytométrie (right panel). (B) Total RNAs were extracted and RT-PCR analyses of *caspase-8* splice variants were performed. *Gapdh* was used as an internal control (left panel). The relative ratio caspase-8L/caspase-8a was calculated in either untreated (grey bars) or treated (black bars) cells after densitometric quantification of the signals (right panel). (C) H358 cells were transfected for 48 h with *mismatch* or *SRPK2* siRNAs and treated or not for 24 additional hours with 100  $\mu$ M cisplatin. Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry after labelling of DNA with propidium iodide. Percentages of cells in the different phases are indicated.

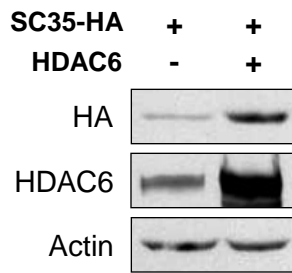
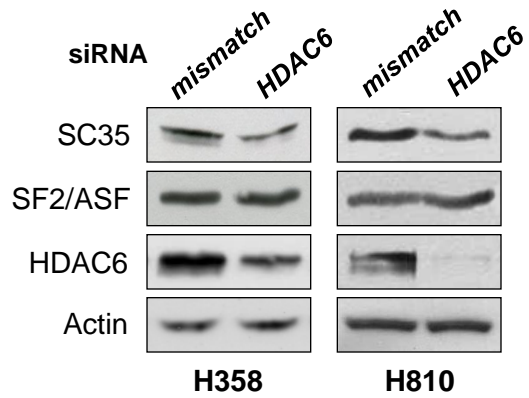
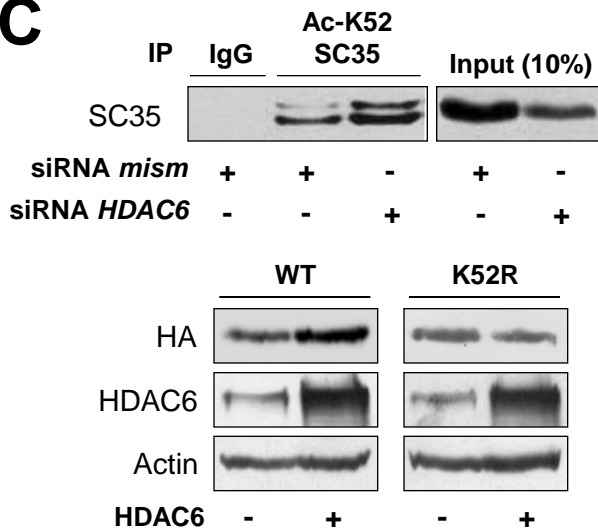
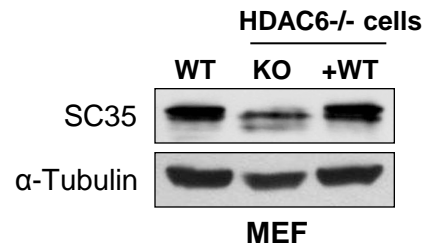
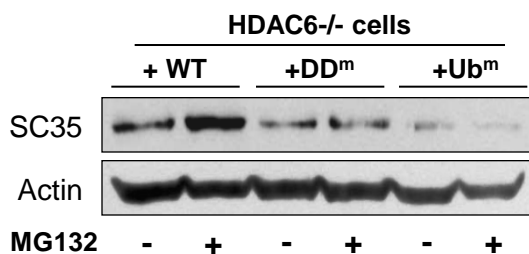
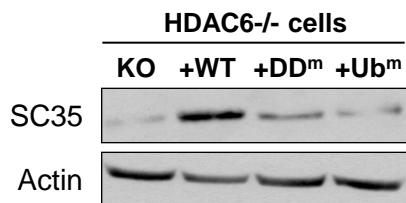
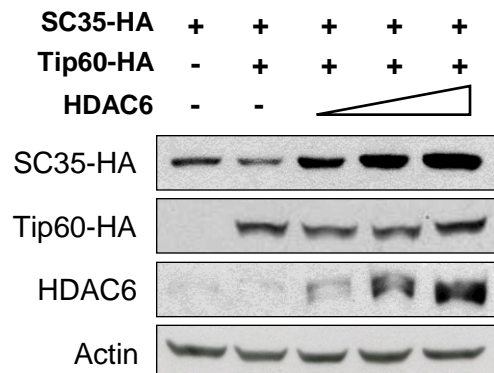
**Figure 7: A model for the roles of Tip60, HDAC6, SRPK1 and SRPK2 proteins in the control of SC35 protein in both unstressed (A) and genotoxic stressed (B) conditions.** (A) Under physiological conditions, Tip60 acetylates SC35 on its lysine 52 residue and prevents SRPK1 and SRPK2 nuclear localization. SC35 accumulates in a hyperacetylated/hypophosphorylated form that is subjected to proteasomal degradation. This effect is counterbalanced by the HDAC6 deacetylase which positively controls SC35 protein level by deacetylating SC35 and preventing its proteasomal degradation. Of note, when conditions occur in which both Tip60 and HDAC6 proteins are highly expressed, SC35 could

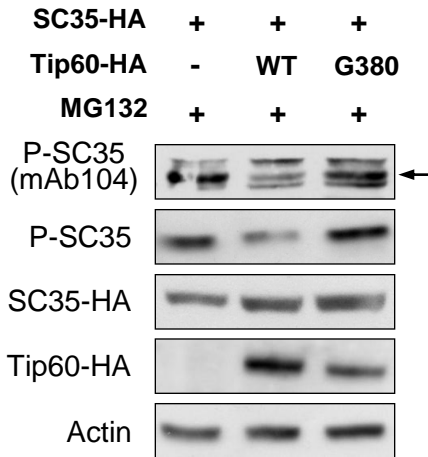
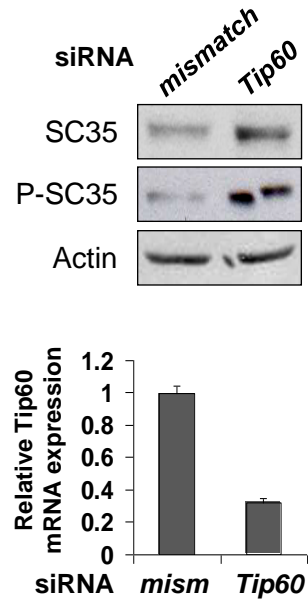
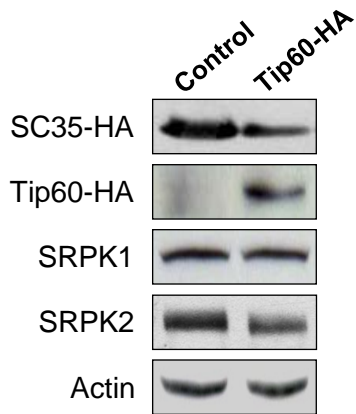
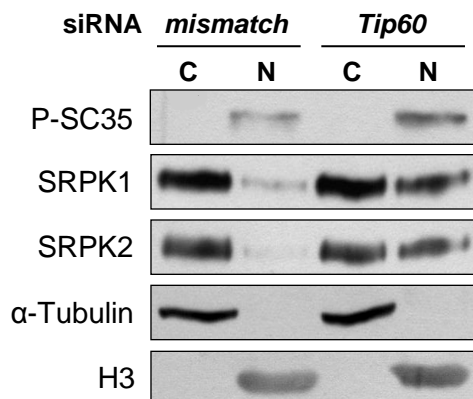
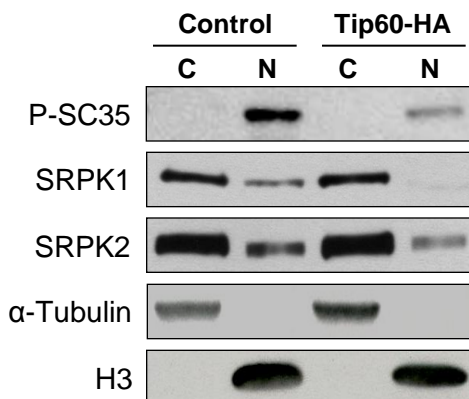
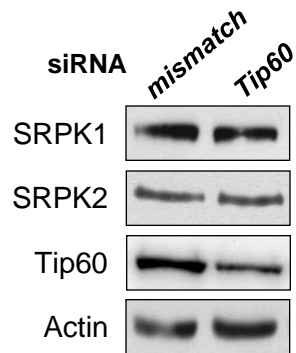
be stabilized in a hyperacetylated/hypophosphorylated form. **(B)** Upon cisplatin treatment, Tip60 protein level strongly decreases leading to the nuclear accumulation of both SRPK1 and SRPK2 kinases, to the stabilization of SC35 in a hypoacetylated/phosphorylated form by a mechanism involving HDAC6, and to the induction of apoptosis. Interestingly, in treated cells, both SRPK1 and SRPK2 kinases appear to act in an opposite way. SRPK2 phosphorylates SC35 and is absolutely required for apoptosis induction. In these conditions, both SC35 and SRPK2 proteins control the splicing pattern of *caspase-8* in favor of its pro-apoptotic splice variant. In contrast, SRPK1 acts as an anti-apoptotic factor since its knock-down enhances apoptosis upon exposure to cisplatin. Whether this effect reflects a negative control exerted by SRPK1 on SRPK2 remains to be determined. In the absence of SRPK2, apoptosis is blocked and treated cells accumulates in G<sub>2</sub>/M phase indicating that SRPK-mediated SC35 phosphorylation controls cell fate decision. Whether SRPK1 plays a direct role in this G<sub>2</sub>/M arrest remains to be determined.

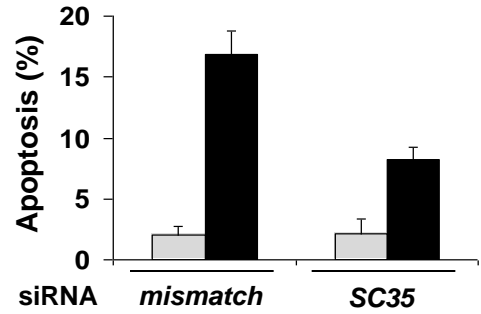
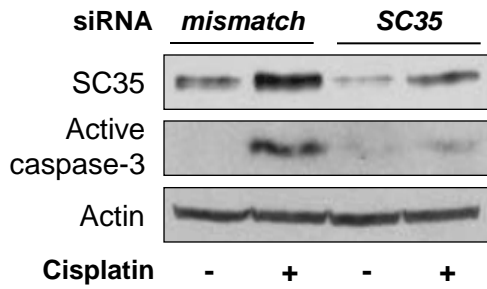
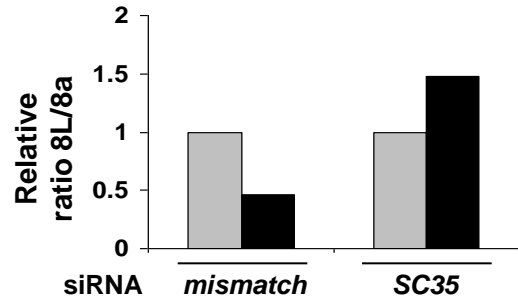
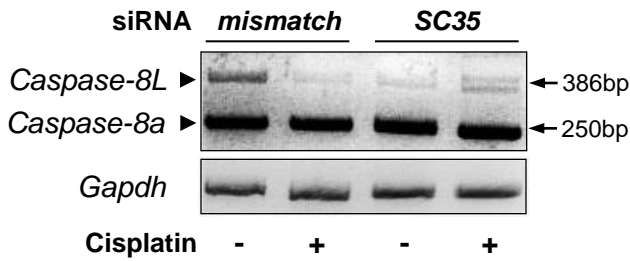
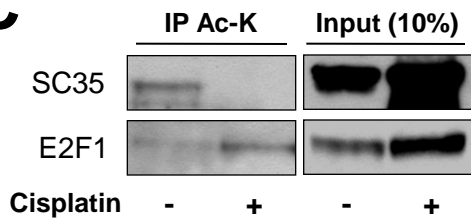
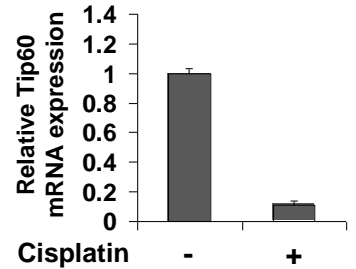
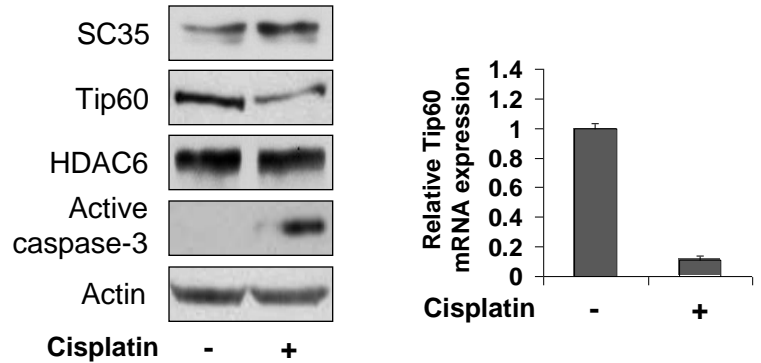
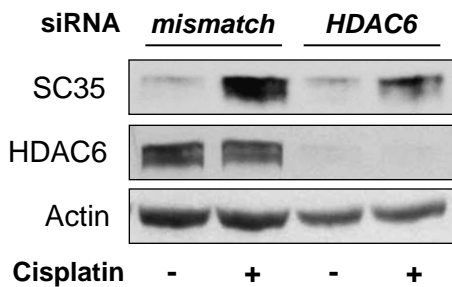
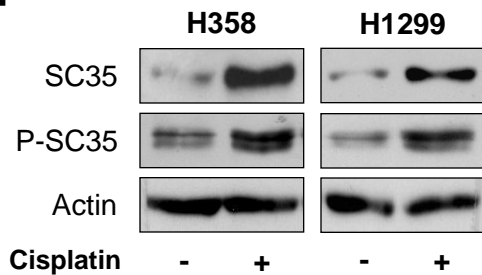
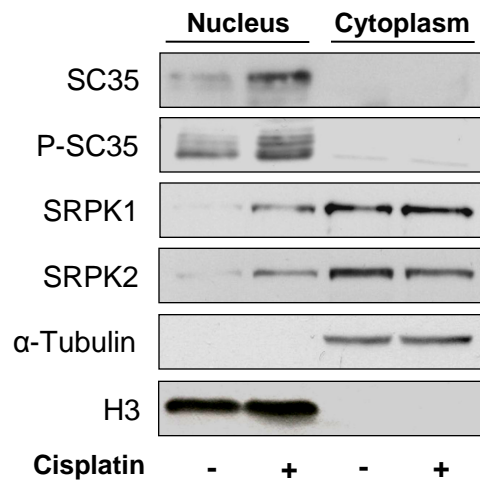
**A****B****C****D****E****F**

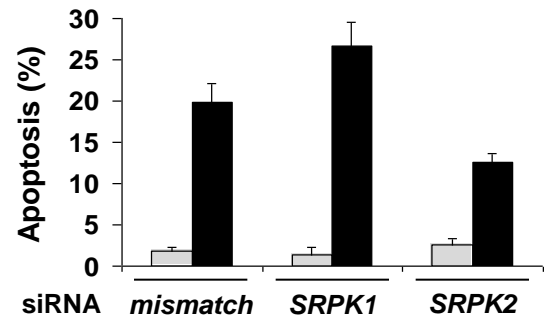
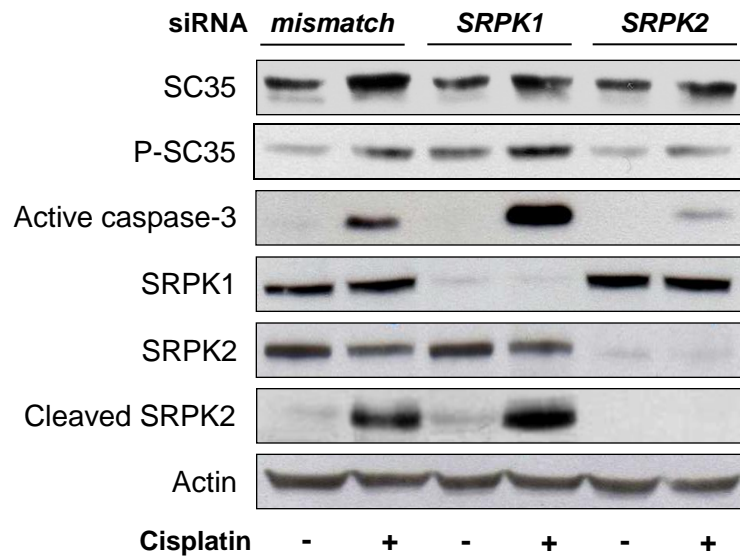
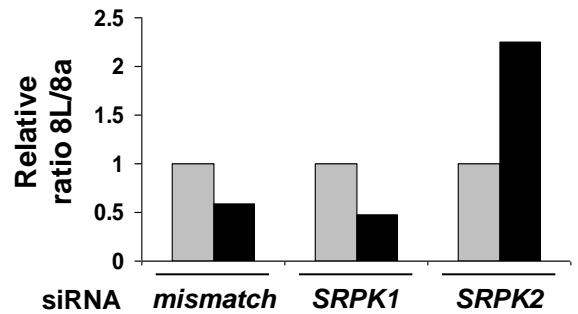
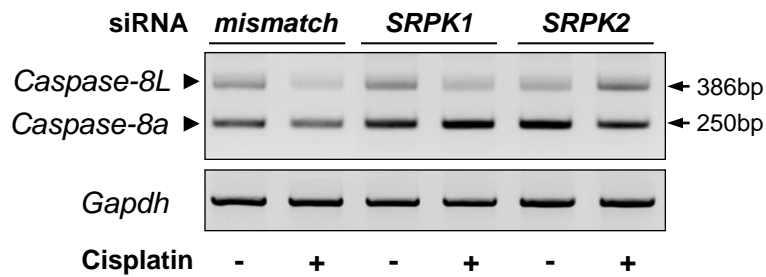
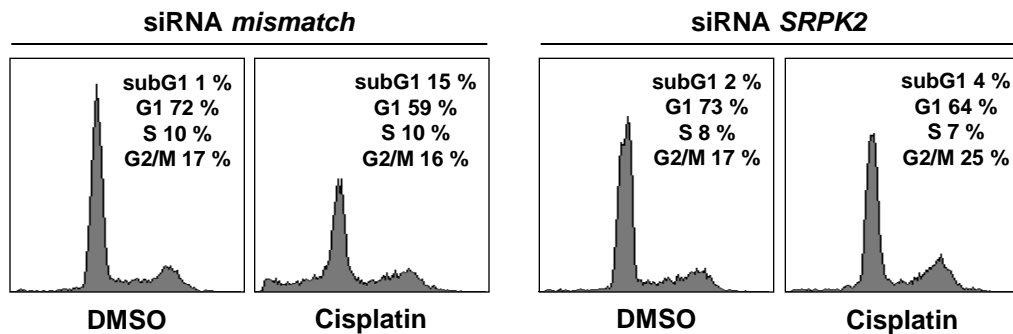


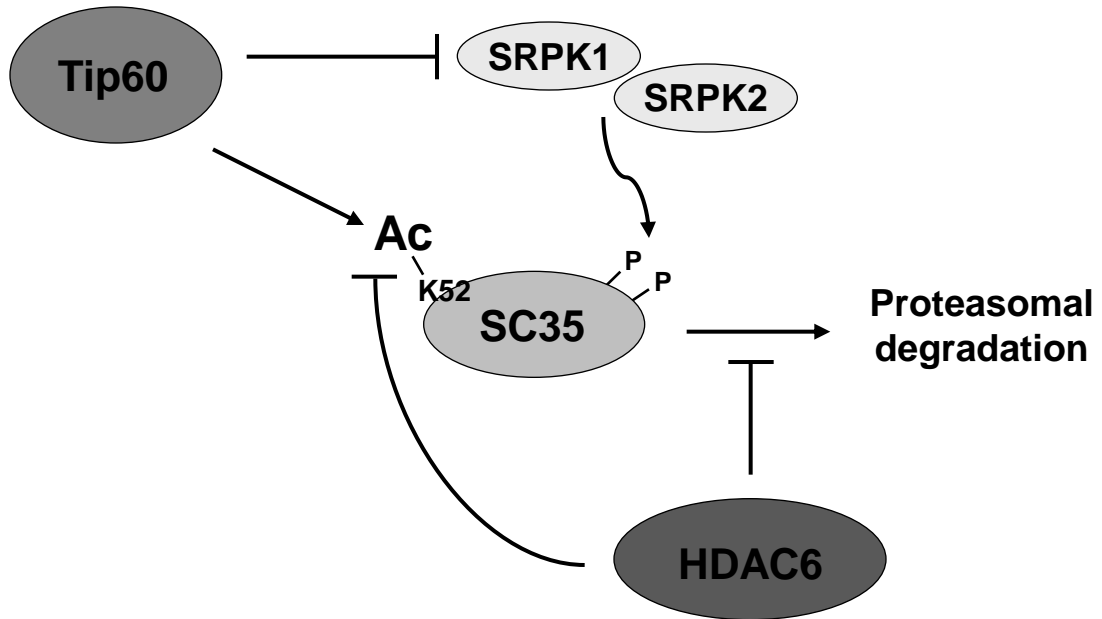
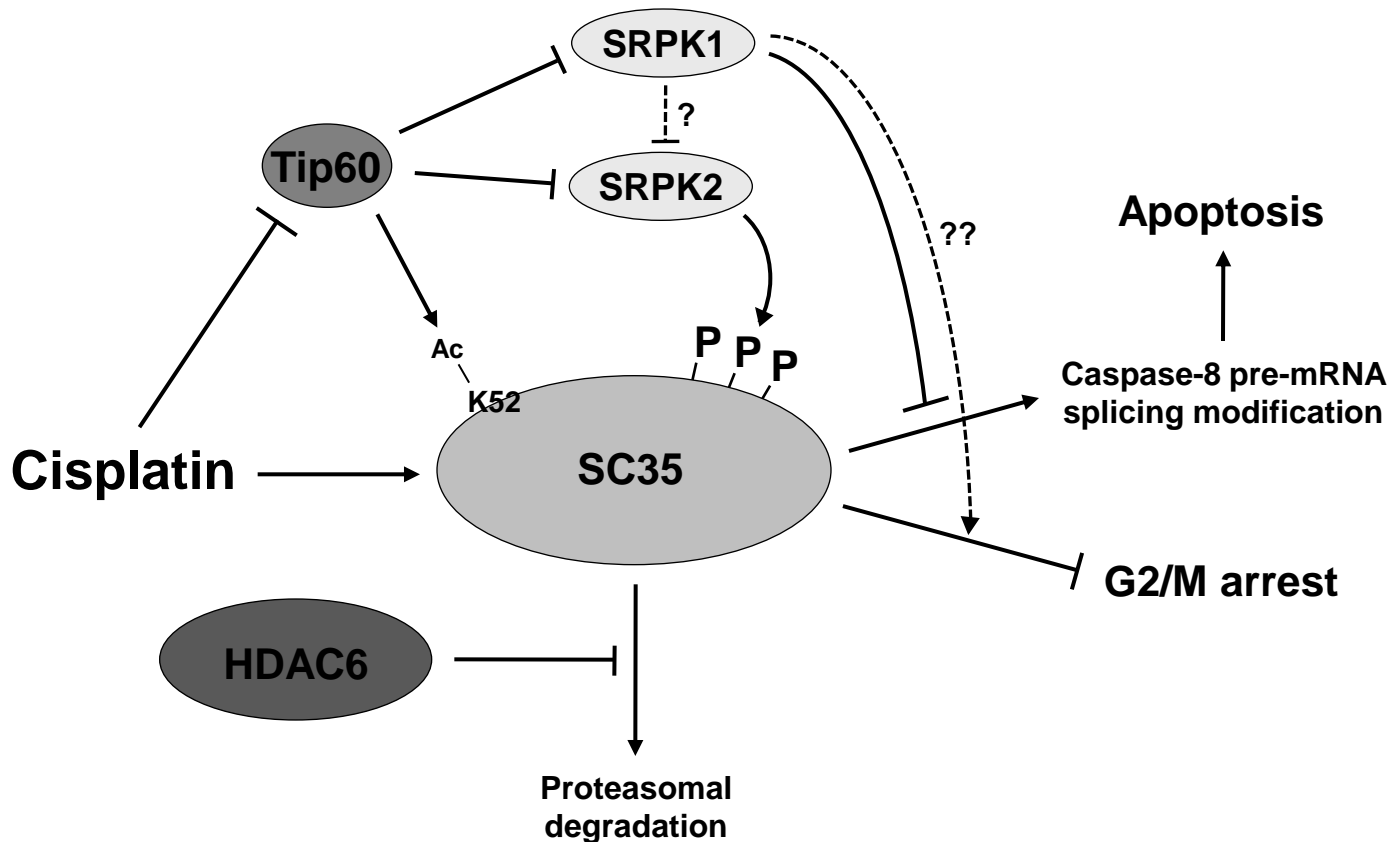
**A****B****C****D****E**

**A****B****C****D****E****G**

**A****B****C****D**

**A****B****C****D****E****F****G**

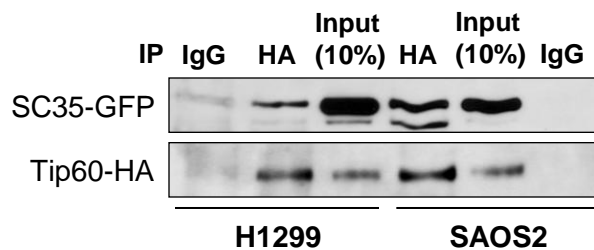
**A****B****C**

**A** In physiological conditions**B** Under cisplatin treatment

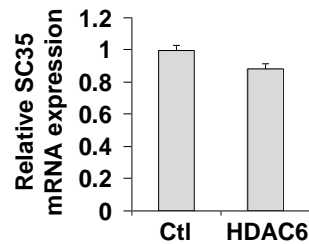
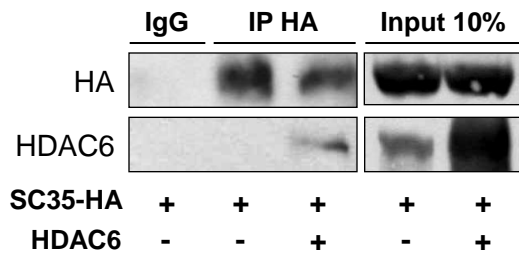
## SUPPLEMENTAL DATA

**Post-translational modifications of the SR protein SC35 through Tip60-, HDAC6- and SRPK-dependent signalling networks control cell fate decision in response to cisplatin**

Valerie Edmond, Elodie Moysan, Saadi Khochbin, Christian Brambilla, Elisabeth Brambilla, Sylvie Gazzeri and Beatrice Eymin

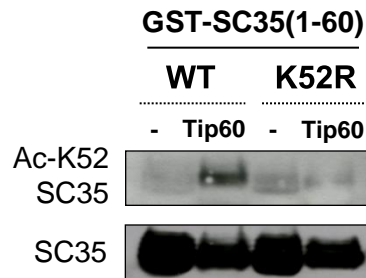


**Supplemental Figure 1.** H1299 and SAOS2 cells were transfected for 48 h with both GFP-tagged SC35 and HA-tagged Tip60 encoding vectors. Whole cellular extracts were immunoprecipitated with anti-HA or control (IgG) antibody and immunoblotted with anti-GFP or anti-HA antibody.

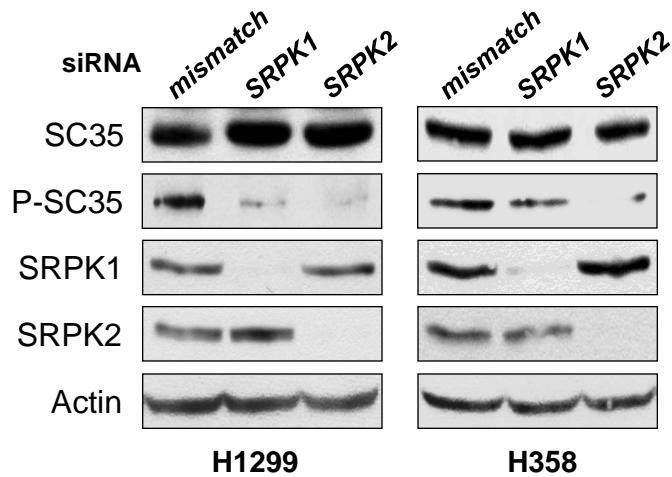
**A****B**

**Supplemental Figure 2.** (A) H1299 cells were co-transfected with HA-tagged SC35 encoding plasmid and either a control plasmid (Ctl) or Flag-tagged HDAC6 expression vector. Expression of SC35 transcript was analyzed by RT-QPCR. (B) H1299 cells were transfected for 24 h with HA-SC35 encoding plasmid, in the presence or absence of a Flag-tagged HDAC6 expression vector and treated for 18 additional hours with the proteasomal inhibitor MG132. Whole-cellular extracts were immunoprecipitated with anti-HA or control (IgG) antibody and immunoblotted with anti-HA or anti-HDAC6 antibody.





**Supplemental Figure 3.** GST-SC35 (1-60) WT or K52R recombinant proteins were incubated with cold acetyl-CoA in the presence (+) or absence (-) of recombinant His-tagged Tip60<sup>212-513</sup>. SC35 acetylation was revealed by western blot using a specific antibody directed against SC35 acetylated on lysine 52 (Ac-K52 SC35). Equivalent amounts of GST-SC35 (1-60) WT or K52R were controlled by western blot using an anti-SC35 antibody raised against the N-terminal part of the protein.



**Supplemental Figure 4.** H1299 and H358 cells were transfected for 72 h with either *mismatch*, *SRPK1* or *SRPK2* siRNAs. Whole cellular extracts were immunoblotted with anti-SC35 or anti-P-SC35 antibody. Knock-down efficiency was assessed using anti-SRPK1 or anti-SRPK2 antibody. Actin was used as a loading control.

## **II. ARTICLE 2**

**SC35 is required for sodium butyrate-mediated p21<sup>WAF1</sup> induction and premature senescence in human lung carcinoma cell lines**

---

**Abstract**

## **Introduction**

## **Materials and Methods**

### **Cell lines, treatments, plasmids and transfection**

M h d c i e, 10 M

(R che Diag ic) acc di g he ma fac e i c i . Pla mid ed i a ie

**Antibodies**

**Transfection of siRNA oligonucleotides**

	<i>sc35</i>	<i>HDAC6</i>	
			<i>sc35</i> , 5
3	a d		5
	3 ;	<i>HDAC6</i> ,	5
3 a d 5			3
	<i>TIP60</i>		
	5'-GAAGAUCCAGUCCCCAAG-3' and 5'-		
CGAAACGGAAGGUGGAGGU-3'.			<i>mismatch</i>
siRNA lig cle ide ed a a c l a 5			3 . Cell

acc di g he ma fac e i c i (I i ge , Ce g P i e, F a ce). The cell

**Cellular fractionation**

**Immunoprecipitation and western blotting experiments**

**DNA content analysis by flow cytometry**



## Quantitative real time RT-PCR

3 ; *sc35* e e e: 5  
3 ; *TIP60* f a d: 5  
3 ; *GAPDH* f a d: 5  
5

*sc35* f a d: 5  
3 ; *TIP60* e e e: 5  
3 ; *GAPDH*

3 .

## SA-β-Gal assays

i d l l

## Results

**SC35 is upregulated in human lung carcinoma cell lines treated with NaBu**

*sc35*

**SC35 is acetylated in response to NaBu**

**NaBu negatively controls SC35 phosphorylation**

**SC35, TIP60 and HDAC6 proteins are required for p21<sup>WAF1</sup> accumulation in response to NaBu**

**SC35 is involved in NaBu-mediated cellular senescence**

γ

γ

$\beta$

$\beta$

$\beta$

$\beta$

$\beta-$

## **Discussion**

*in vivo*

$p21^{WAF1}$

$p21^{WAF1}$

$p21^{WAF1}$

$p21^{WAF1}$

$p21^{WAF1}$

$p21^{WAF1}$   
 $p21^{WAF1}$

$\gamma$

$\gamma$

$\gamma$   
 $p21^{WAF1}$

$p21^{WAF1}$

$p21^{WAF1}$

## Acknowledgements

We thank Pascal Perron, Celine Barrial-Lampreia and Floriane Albert for technical assistance. This work was supported by the Comité Départemental Isère de la Ligue contre le Cancer and by the Conseil Scientifique National d'AGIR *à dom*. Valerie Edmond was supported by a grant from the Conseil Scientifique National d'AGIR *à dom*.

## References

1. Shepard PJ, Hertel KJ. The SR protein family. *Genome Biol* 2009; 10:242.
2. Long JC, Caceres JF. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J* 2009; 417:15-27.
3. Stamm S. Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem* 2008; 283:1223-7.
4. Wang J, Takagaki Y, Manley JL. Targeted disruption of an essential vertebrate gene: ASF/SF2 is required for cell viability. *Genes Dev* 1996; 10:2588-99.
5. Lin S, Xiao R, Sun P, Xu X, Fu XD. Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation. *Mol Cell* 2005; 20:413-25.
6. Moroy T, Heyd F. The impact of alternative splicing in vivo: mouse models show the way. *RNA* 2007; 13:1155-71.
7. Li X, Manley JL. Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell* 2005; 122:365-78.



8. Tuduri S, Crabbe L, Conti C, Tourriere H, Holtgreve-Grez H, Jauch A, et al. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat Cell Biol* 2009; 11:1315-24.
9. Xiao R, Sun Y, Ding JH, Lin S, Rose DW, Rosenfeld MG, et al. Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and cell proliferation during mammalian organogenesis. *Mol Cell Biol* 2007; 27:5393-402.
10. Jiang ZH, Zhang WJ, Rao Y, Wu JY. Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:9155-60.
11. Li X, Wang J, Manley JL. Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes Dev* 2005; 19:2705-14.
12. Merdzhanova G, Edmond V, De Seranno S, Van den Broeck A, Corcos L, Brambilla C, et al. E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ* 2008; 15:1815-1823.
13. Ghigna C, Moroni M, Porta C, Riva S, Biamonti G. Altered expression of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and SR factors in human colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; 58:5818-24.
14. Stickeler E, Kittrell F, Medina D, Berget SM. Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. *Oncogene* 1999; 18:3574-82.
15. Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB, Watermann DO, Kieback DG, Stamm S, et al. Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 2004; 11:1085-90.
16. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14:185-93.
17. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1:287-99.
18. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:38-51.
19. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1210-6.
20. Peart MJ, Tainton KM, Ruefli AA, Dear AE, Sedelies KA, O'Reilly LA, et al. Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res* 2003; 63:4460-71.
21. Piekarz R, Bates S. A review of depsipeptide and other histone deacetylase inhibitors in clinical trials. *Curr Pharm Des* 2004; 10:2289-98.
22. Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA. p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:6791-6.
23. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:10014-9.
24. Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:1241-6.

25. Varshochi R, Halim F, Sunter A, Alao JP, Madureira PA, Hart SM, et al. ICI182,780 induces p21Waf1 gene transcription through releasing histone deacetylase 1 and estrogen receptor alpha from Sp1 sites to induce cell cycle arrest in MCF-7 breast cancer cell line. *J Biol Chem* 2005; 280:3185-96.
26. Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H. Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9808-13.
27. Nissim-Rafinia M, Aviram M, Randell SH, Shushi L, Ozeri E, Chiba-Falek O, et al. Restoration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function by splicing modulation. *EMBO Rep* 2004; 5:1071-7.
28. Salon C, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C, et al. E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* 2006; 13:260-72.
29. Ding JH, Zhong XY, Hagopian JC, Cruz MM, Ghosh G, Feramisco J, et al. Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2006; 17:876-85.
30. Lee E, Furukubo T, Miyabe T, Yamauchi A, Kariya K. Involvement of histone hyperacetylation in triggering DNA fragmentation of rat thymocytes undergoing apoptosis. *FEBS Lett* 1996; 395:183-7.
31. McBain JA, Eastman A, Nobel CS, Mueller GC. Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1997; 53:1357-68.
32. Medina V, Edmonds B, Young GP, James R, Appleton S, Zalewski PD. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res* 1997; 57:3697-707.
33. Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann DA, el-Houseini ME. Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 1994; 9:3389-96.
34. Buquet-Fagot C, Lallemand F, Charollais RH, Mester J. Sodium butyrate inhibits the phosphorylation of the retinoblastoma gene product in mouse fibroblasts by a transcription-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 1996; 166:631-6.
35. Nakano K, Mizuno T, Sowa Y, Orita T, Yoshino T, Okuyama Y, et al. Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. *J Biol Chem* 1997; 272:22199-206.
36. Terao Y, Nishida J, Horiuchi S, Rong F, Ueoka Y, Matsuda T, et al. Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecologic cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 94:257-67.
37. Inoue T, Kato K, Kato H, Asanoma K, Kuboyama A, Ueoka Y, et al. Level of reactive oxygen species induced by p21Waf1/CIP1 is critical for the determination of cell fate. *Cancer Sci* 2009; 100:1275-83.
38. Pospelova TV, Demidenko ZN, Bukreeva EI, Pospelov VA, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle* 2009; 8:4112-8.
39. Zerbe LK, Pino I, Pio R, Cosper PF, Dwyer-Nield LD, Meyer AM, et al. Relative amounts of antagonistic splicing factors, hnRNP A1 and ASF/SF2, change during neoplastic lung growth: implications for pre-mRNA processing. *Mol Carcinog* 2004; 41:187-96.
40. Guardiola AR, Yao TP. Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J Biol Chem* 2002; 277:3350-6.

41. Dai Y, Rahmani M, Grant S. An intact NF-kappaB pathway is required for histone deacetylase inhibitor-induced G1 arrest and maturation in U937 human myeloid leukemia cells. *Cell Cycle* 2003; 2:467-72.
42. Kobayashi H, Tan EM, Fleming SE. Sodium butyrate inhibits cell growth and stimulates p21WAF1/CIP1 protein in human colonic adenocarcinoma cells independently of p53 status. *Nutr Cancer* 2003; 46:202-11.
43. Rocchi P, Tonelli R, Camerin C, Purgato S, Fronza R, Bianucci F, et al. p21Waf1/Cip1 is a common target induced by short-chain fatty acid HDAC inhibitors (valproic acid, tributyrin and sodium butyrate) in neuroblastoma cells. *Oncol Rep* 2005; 13:1139-44.
44. Lee S, Park JR, Seo MS, Roh KH, Park SB, Hwang JW, et al. Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation potential and multilineage differentiation capability of human mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2009; 42:711-20.
45. Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 2004; 428:431-7.
46. Legube G, Linares LK, Tyteca S, Caron C, Scheffner M, Chevillard-Briet M, et al. Role of the histone acetyl transferase TIP60 in the p53 pathway. *J Biol Chem* 2004; 279:44825-33.
47. Tyteca S, Vandromme M, Legube G, Chevillard-Briet M, Trouche D. Tip60 and p400 are both required for UV-induced apoptosis but play antagonistic roles in cell cycle progression. *EMBO J* 2006; 25:1680-9.
48. Gevry N, Chan HM, Laflamme L, Livingston DM, Gaudreau L. p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* 2007; 21:1869-81.
49. Park JH, Sun XJ, Roeder RG. The SANT domain of p400 ATPase represses acetyltransferase activity and coactivator function of TIP60 in basal p21 gene expression. *Mol Cell Biol* 2010; 30:2750-61.
50. Espinosa JM, Verdun RE, Emerson BM. p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol Cell* 2003; 12:1015-27.
51. Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, et al. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:4291-6.
52. Abramova MV, Pospelova TV, Nikulenkov FP, Hollander CM, Fornace AJ, Jr., Pospelov VA. G1/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A + Ras-transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem* 2006; 281:21040-51.
53. Hubbard K, Dhanaraj SN, Sethi KA, Rhodes J, Wilusz J, Small MB, et al. Alteration of DNA and RNA binding activity of human telomere binding proteins occurs during cellular senescence. *Exp Cell Res* 1995; 218:241-7.
54. Zhu D, Xu G, Ghandhi S, Hubbard K. Modulation of the expression of p16INK4a and p14ARF by hnRNP A1 and A2 RNA binding proteins: implications for cellular senescence. *J Cell Physiol* 2002; 193:19-25.
55. Bai L, Kao JY, Law DJ, Merchant JL. Recruitment of ataxia-telangiectasia mutated to the p21(waf1) promoter by ZBP-89 plays a role in mucosal protection. *Gastroenterology* 2006; 131:841-52.
56. Sun Y, Jiang X, Price BD. Tip60: connecting chromatin to DNA damage signaling. *Cell Cycle* 2010; 9:930-6.

57. Ito Y, Ide T, Mitsui Y. Expressional changes in alternative splicing affecting genes during cell passage of human diploid fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 1998; 105:105-114.

## Figure legends

**Figure 1: NaBu specifically induces the accumulation of SC35 in lung carcinoma cell lines.**

*sc35*

*gapdh*

*sc35*

*sc35*

*gapdh*

**Figure 2: TIP60-mediated SC35 acetylation is increased under NaBu treatment.**

*TIP60*

*mismatch*    *TIP60*

*mismatch*    *TIP60*

*mismatch*    *HDAC6*

**Figure 3: NaBu negatively controls SC35 phosphorylation.**

la mic

**Figure 4: SC35 is required for p21<sup>WAF1</sup> accumulation in response to NaBu.**

*mismatch*    *sc35*

*p21<sup>WAF1</sup>*

*mismatch*    *TIP60*

$p21^{WAF1}$

*mismatch*    *HDAC6*

**Figure 5: SC35 is involved in NaBu-induced senescence.**

*mismatch*    *sc35*

H2AX  
*TIP60*

*mismatch*

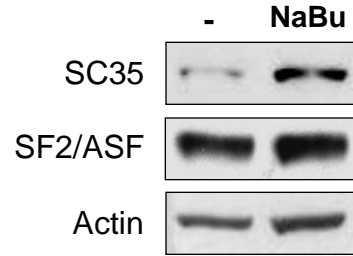
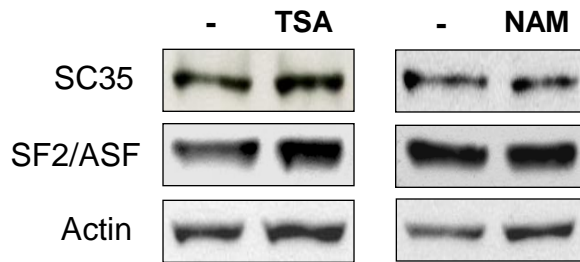
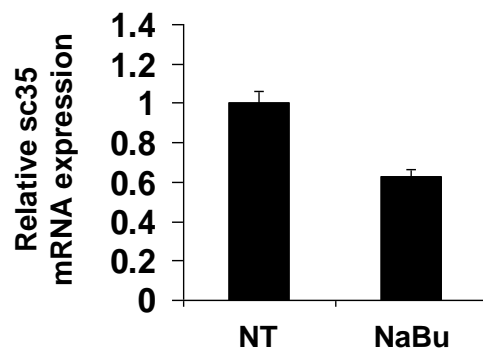
*mismatch*    *sc35*

**Figure 6: An hypothetic model of NaBu-induced SC35 accumulation and senescence.**

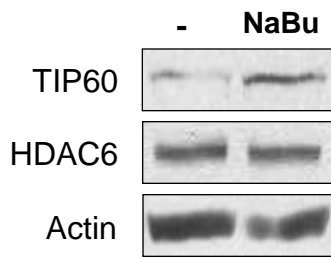
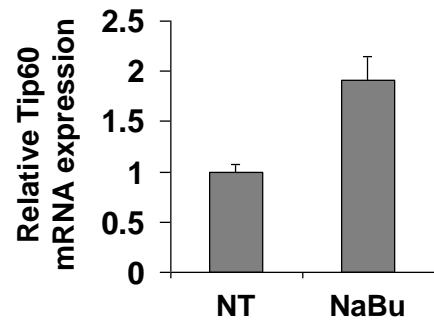
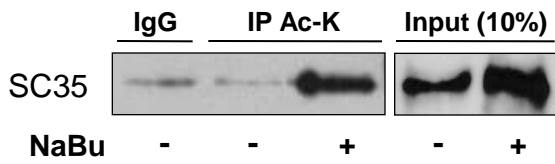
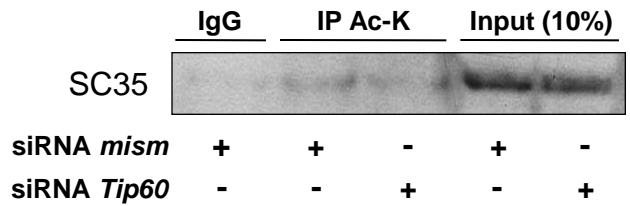
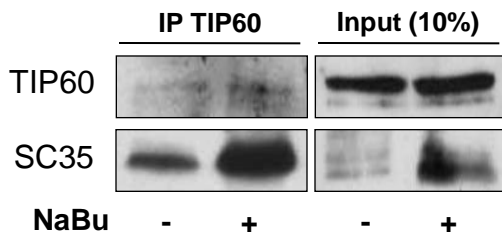
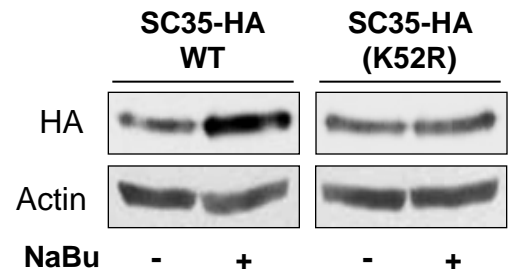
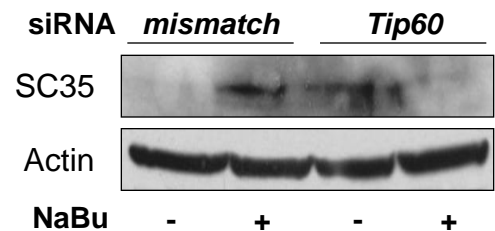
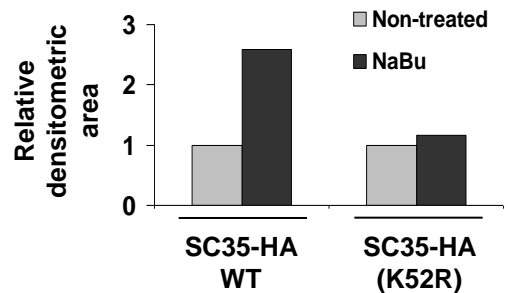
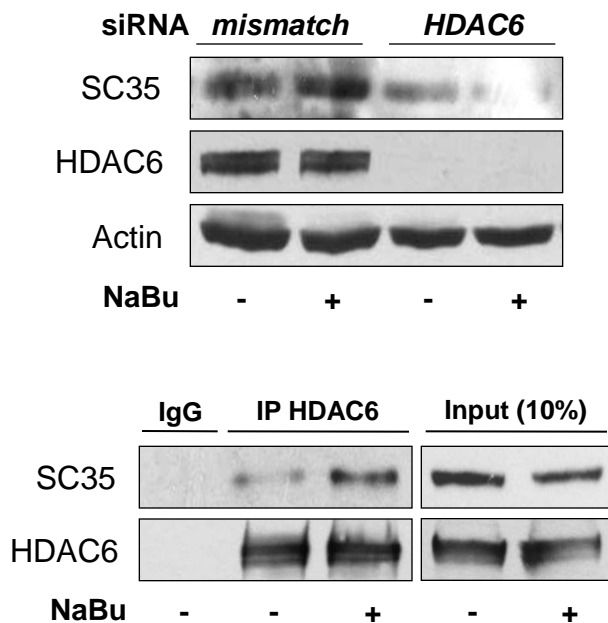
$p21^{WAF1}$

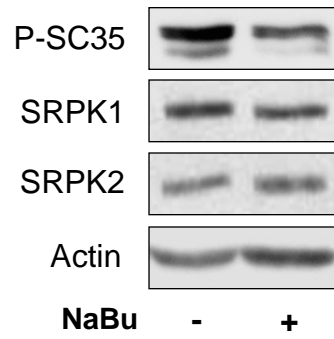
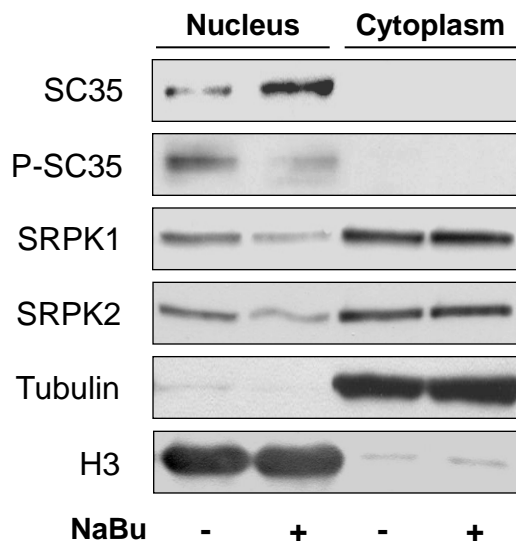
$p21^{WAF1}$

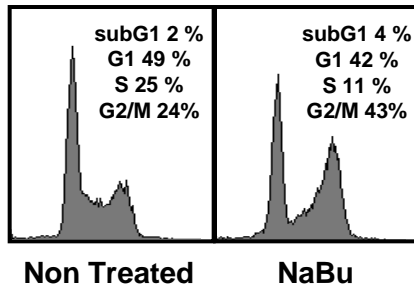
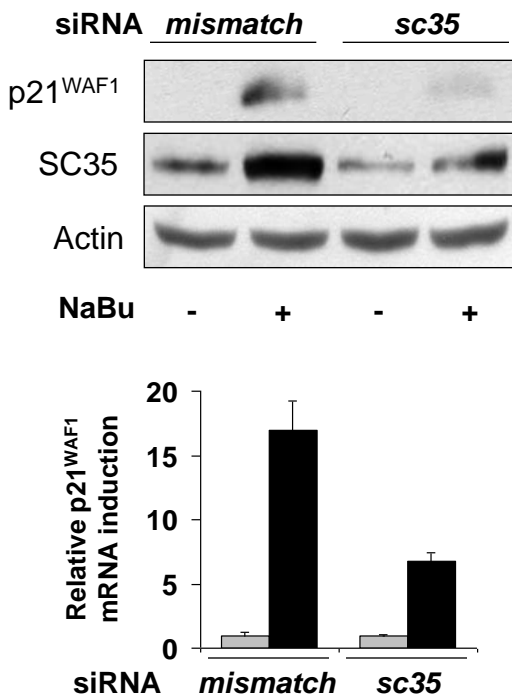
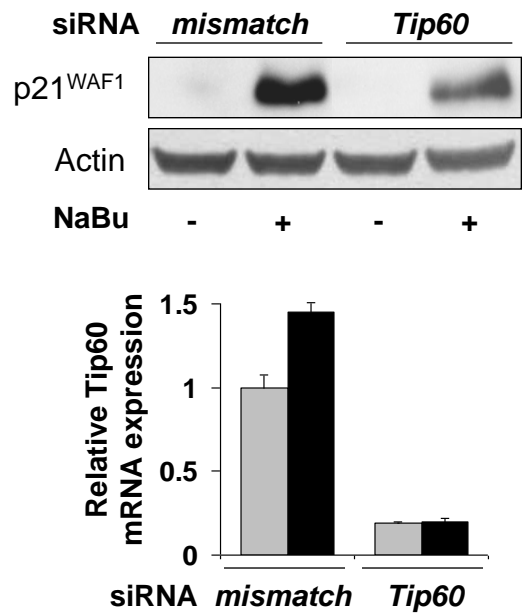
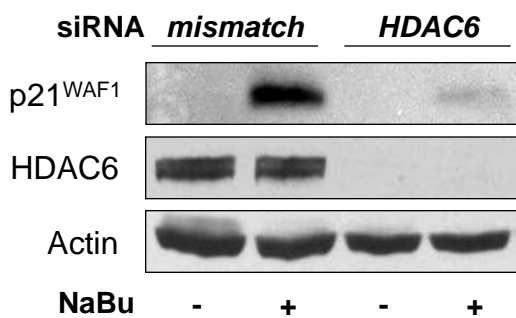
$p21^{WAF1}$

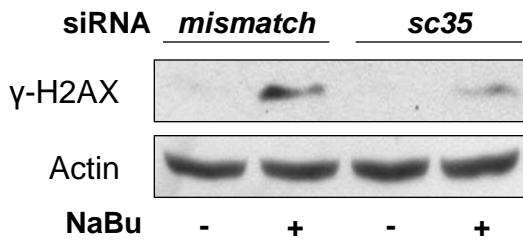
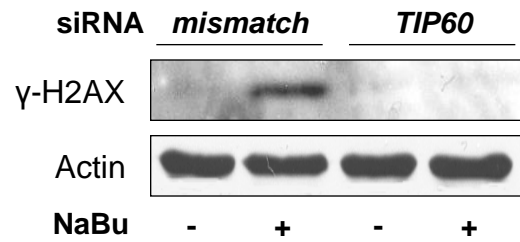
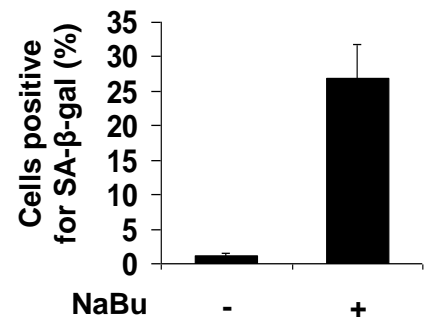
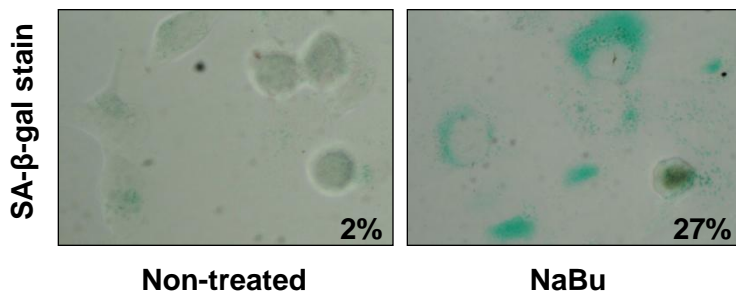
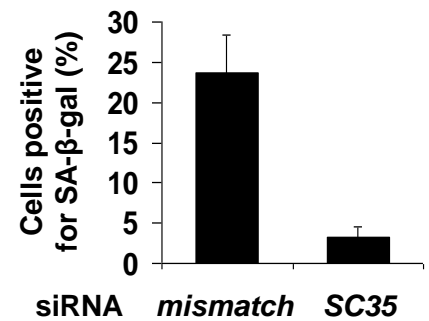
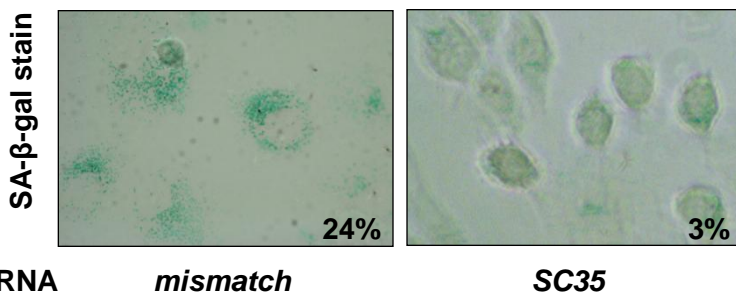
**A****B****C**

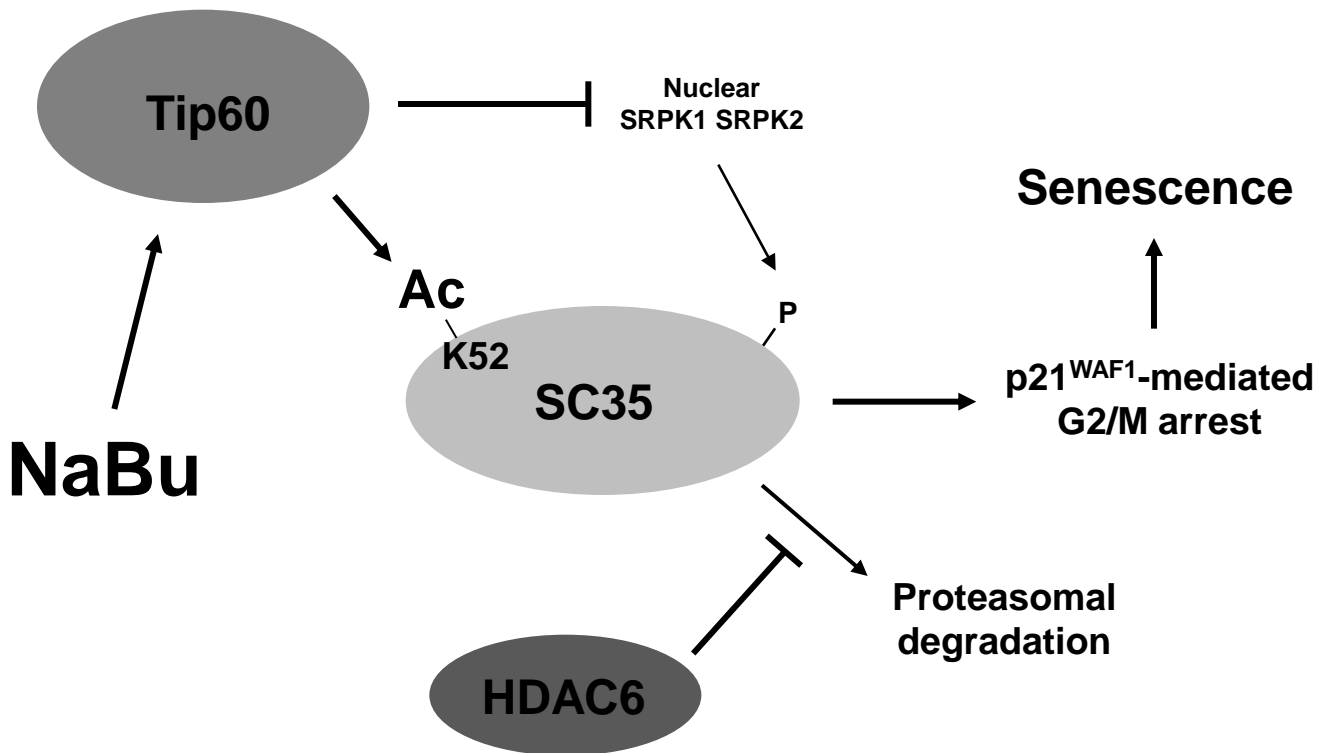


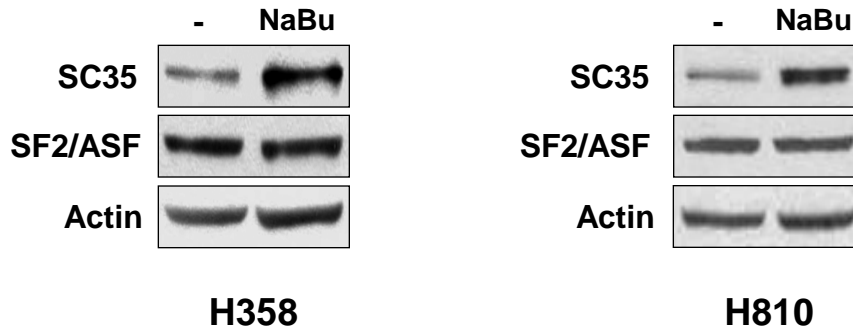
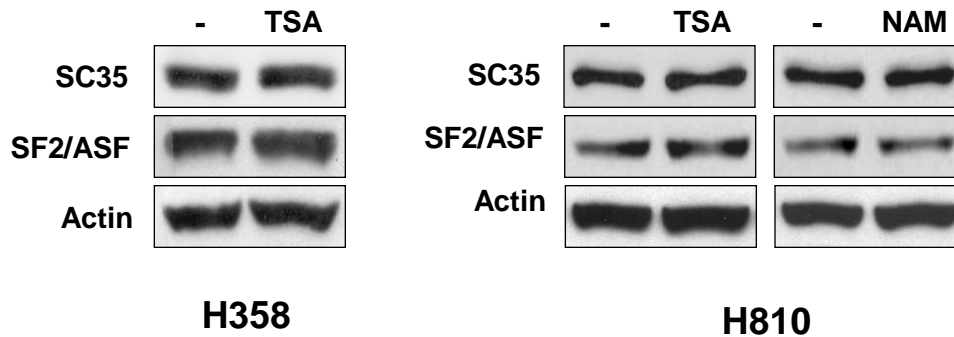
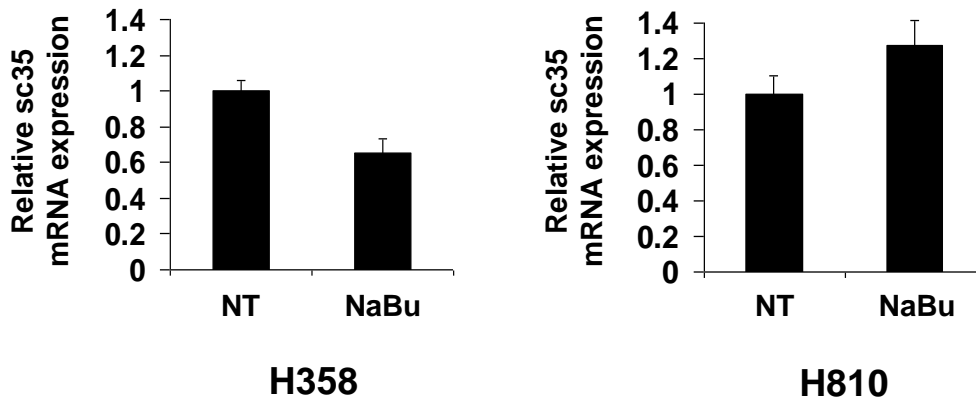
**A****B****C****H1299****D****E****H810****F****G**

**A****B**

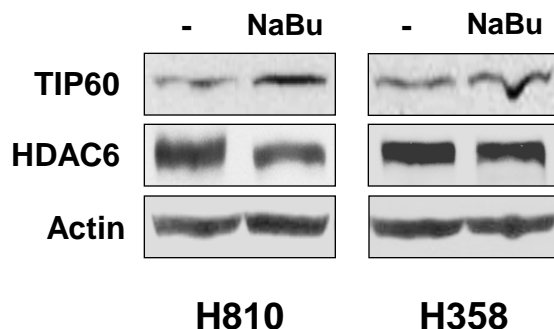
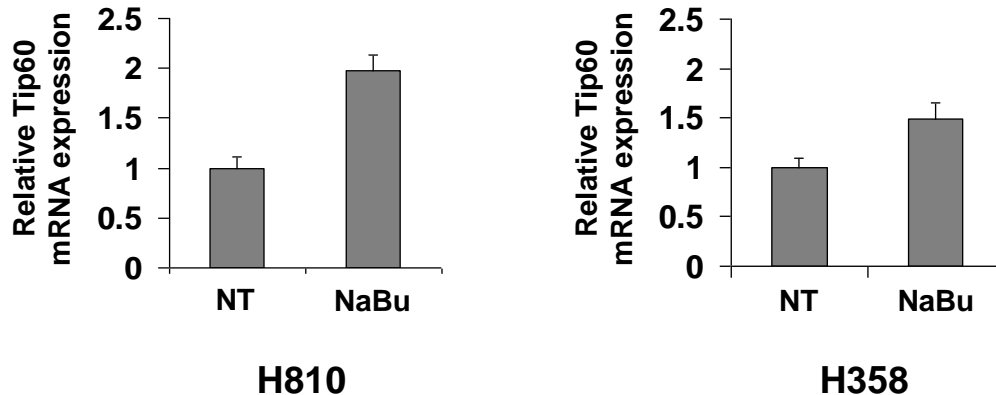
**A****B****C****D**

**A****B****C****D**

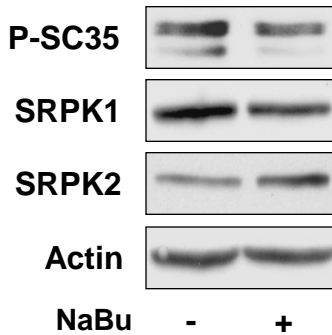
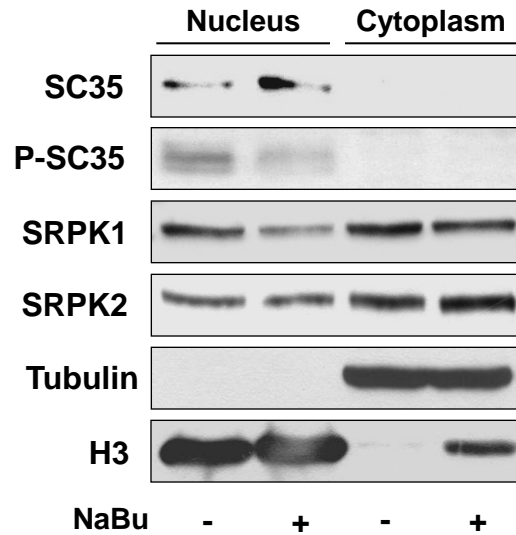


**A****B****C**

**Figure S1.** (A) H358 and H810 cells were treated or not for 20 h with 5 mM NaBu and the expression of SC35 and SF2/ASF proteins was studied by western blotting. Actin was used as a loading control. (B) H358 and H810 cells were treated for 20 h with 100 ng/ml TSA or 2 mM NAM as indicated. Whole-cellular extracts were analyzed by western blotting using anti-SC35 or anti-SF2/ASF antibody. (C) H358 and H810 cells were treated or not for 20 h with 5 mM NaBu and *sc35* mRNA level was quantified by RT-qPCR. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) was used as a reference. Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of *sc35* copy number (target gene) to *gapdh* mRNA copy number multiplied by 100, thus normalizing *sc35* mRNA expression. The ratio obtained in non treated cells was arbitrarily assigned a value of 1.

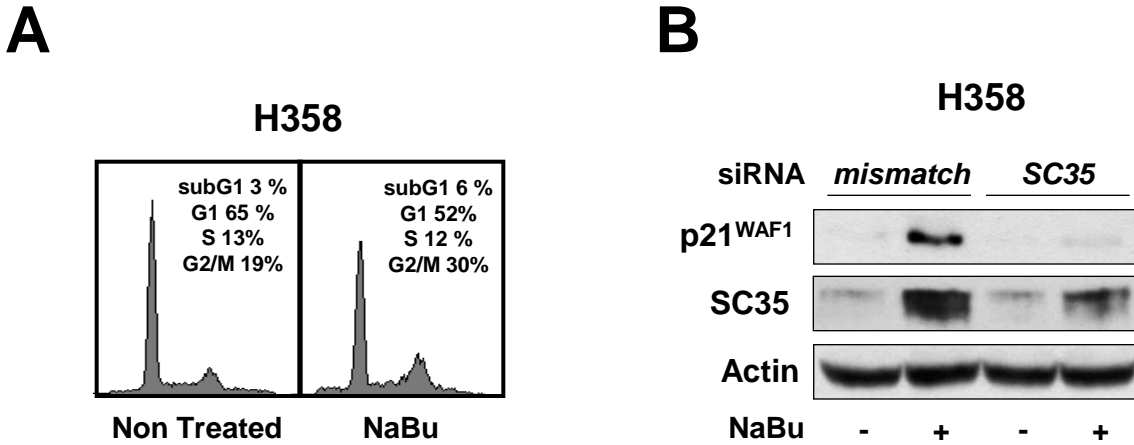
**A****B**

**Figure S2. (A)** H810 and H358 cells were treated or not for 20 h with 5 mM NaBu and the expression of TIP60 and HDAC6 proteins was studied by western-blotting. Actin was used as a loading control. **(B)** Total RNA was extracted from H810 and H358 cells treated or not for 20 h with NaBu and *Tip60* transcripts were quantified by RT-qPCR. Normalization was done as described above.

**A****B**

**Figure S3. (A)** H358 cells were treated or not for 20 h with 5 mM NaBu and total cellular extracts were subjected to western blot analysis in order to detect P-SC35, SRPK1 and SRPK2 proteins. Actin was used as a loading control. **(B)** Cytoplasmic and nuclear extracts from H358 cells treated or not for 20 h with 5 mM NaBu were subjected to western blot analysis using the indicated antibodies. Quality of cellular fractionation was controlled by immunodetection of the cytoplasmic  $\alpha$ -tubulin or the nuclear histone H3.





**Figure S4. (A)** H358 cells were treated or not for 20 hours with 5 mM NaBu and the cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Percentages of cells in the different phases are indicated. **(B)** H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *sc35* siRNAs and treated (+) or not (-) for 20 additional hours with 5 mM NaBu. Western blot analysis was performed for the detection of p21<sup>WAF1</sup> protein. Efficiency of the knockdown was assessed by immunoblotting using an anti-SC35 antibody.

### III. ARTICLE 3

#### **E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35**

Galina Merdzhanova<sup>1,2</sup>, Valerie Edmond<sup>1,2</sup>, Sandrine De Seranno<sup>1,2</sup>, Arnaud Van den Broeck<sup>1,2</sup>, Laurent Corcos<sup>3</sup>, Christian Brambilla<sup>1,2</sup>, Elisabeth Brambilla<sup>1,2</sup>, Sylvie Gazzeri<sup>1,2</sup> and Beatrice Eymin<sup>1,2\*</sup>.

**Cell Death and Differentiation (2008) 15, 1815-1823.**

<sup>1</sup> INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, 38042, France.

<sup>2</sup> Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, 38041, France.

<sup>3</sup> INSERM, U613, Brest, 29238, France.

Keywords: alternative splicing; apoptosis; E2F1; SC35; SR proteins

Corresponding author:

Dr. Beatrice Eymin

INSERM U823 Equipe 2

Institut Albert Bonniot, BP170

38042 Grenoble Cedex 09, FRANCE

Tel: +33 4 76 54 94 76 / Fax: +33 4 76 54 94 13

email: [Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr](mailto:Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr)

To whom requests for reprints should be addressed

# E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35

G Merdzhanova<sup>1,2</sup>, V Edmond<sup>1,2</sup>, S De Seranno<sup>1,2</sup>, A Van den Broeck<sup>1,2</sup>, L Corcos<sup>3</sup>, C Brambilla<sup>1,2</sup>, E Brambilla<sup>1,2</sup>, S Gazzeri<sup>1,2</sup> and B Eymin<sup>\*1,2</sup>

The transcription factor E2F1 has a key function during S phase progression and apoptosis. It has been well-demonstrated that the apoptotic function of E2F1 involves its ability to transactivate pro-apoptotic target genes. Alternative splicing of pre-mRNAs also has an important function in the regulation of apoptosis. In this study, we identify the splicing factor SC35, a member of the Ser-Rich Arg (SR) proteins family, as a new transcriptional target of E2F1. We demonstrate that E2F1 requires SC35 to switch the alternative splicing profile of various apoptotic genes such as *c-flip*, *caspases-8* and *-9* and *Bcl-x*, towards the expression of pro-apoptotic splice variants. Finally, we provide evidence that E2F1 upregulates SC35 in response to DNA-damaging agents and show that SC35 is required for apoptosis in response to these drugs. Taken together, these results demonstrate that E2F1 controls pre-mRNA processing events to induce apoptosis and identify the SC35 SR protein as a key direct E2F1-target in this setting. *Cell Death and Differentiation* (2008) 15, 1815–1823; doi:10.1038/cdd.2008.135; published online 19 September 2008

Pre-mRNA splicing is an essential step for the expression of most genes in higher eukaryotic cells. This process has emerged as an important mechanism of genetic diversity as about 74% of human genes undergo alternative splicing, leading to the production of various protein isoforms.<sup>1</sup> SC35 belongs to the serine/arginine-rich (SR) protein family, one of the most important class of splicing regulators. Members of the SR family have a modular structure consisting of one or two copies of an N-terminal RRM (RNA-recognition motif) followed by a C terminus rich in serine and arginine residues known as the RS domain. They act at multiple steps of spliceosome assembly and participate in both constitutive and alternative splicing.<sup>2</sup> Together with most of the other splicing factors, SR proteins localize to nuclear subregions termed nuclear speckles.<sup>3</sup> Extensive serine phosphorylation of the RS domain has an important function in the regulation of both the localization and the activities of SR proteins.<sup>4</sup> Although the splicing functions of SR proteins have been well documented *in vitro*, their roles and physiological targets *in vivo* are less well known. However, based on gene targeting experiments demonstrating that they are required for cell viability and/or animal development, SR proteins undoubtedly control essential biological functions.

Apoptosis is one of the cellular processes in which alternative splicing has an important regulatory function. Indeed, a remarkable number of transcripts that encode proteins involved in the apoptotic pathway are subjected to alternative splicing. This usually drives the expression of proteins with opposite functions, either pro- or anti-apoptotic.<sup>5</sup> Interestingly, changes in

SR protein phosphorylation have been observed upon apoptotic stimulation following activation of the Fas receptor.<sup>6</sup> In addition, *in vitro* overexpression experiments have suggested a potential role for SR proteins in the control of the splicing of pre-mRNAs encoding apoptotic regulators.<sup>7–8</sup> Moreover, depletion of the ASF/SF2 SR protein has been reported to induce apoptosis.<sup>8–9</sup> Nevertheless, whether individual SR proteins are necessary to modulate alternative splicing of mRNAs encoding apoptotic factors remains largely unknown, as well as the factors that control expression and/or activity of SR proteins in this context.

The E2F1 transcription factor belongs to the E2F family encompassing eight members involved in a diverse array of essential cellular functions.<sup>10</sup> E2F1 is best-known for its role in driving cell cycle progression in S phase. In addition, E2F1 can induce apoptosis by mechanisms involving with or without transcriptional function. We previously demonstrated the ability of E2F1 to trigger apoptosis through caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex and showed that E2F1 acts through specific downregulation of the cellular FLICE-inhibitory protein short isoform, c-FLIP<sub>short</sub>.<sup>11</sup> As *c-flip* predominantly encodes two isoforms arising from alternative splicing, namely c-FLIP<sub>short</sub> and c-FLIP<sub>long</sub>, we postulated that E2F1 could control the expression and/or activity of some splicing factors. In this study, we identify the SC35 splicing factor as a direct transcriptional target of E2F1 and show that SC35 is involved in the ability of E2F1 to trigger apoptosis through downregulation of c-FLIP<sub>short</sub>. Importantly, we demonstrate that E2F1 and SC35

<sup>1</sup>INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, 38042, France; <sup>2</sup>Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, 38041, France and <sup>3</sup>INSERM, U613, Brest, 29238, France

\*Corresponding author: B Eymin, INSERM U823, Equipe 2: Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Institut Albert Bonniot, BP170, Domain de la merci, 38042 Grenoble, Cedex 09, France. Tel: +33 4 76 54 94 76; Fax: +33 4 76 54 94 13; E-mail: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr

**Keywords:** alternative splicing; apoptosis; E2F1; SC35; SR proteins

**Abbreviations:** CAT, chloramphenicol acetyl transferase; ChIP, chromatin immunoprecipitation; Fas L, Fas ligand; FLIP, FLICE inhibitory protein; MEF, murine embryonic fibroblast; p54nrb, p54 nuclear RNA-binding protein; PSF, polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor; RRM, RNA recognition motif; siRNA, small interfering RNA; SR, ser-rich; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

Received 22.1.08; revised 13.8.08; accepted 14.8.08; Edited by B Dijnlacht; published online 19.9.08

also cooperate to switch the alternative splicing pattern of *caspases-8* and *-9* as well as of *Bcl-x*, towards the expression of pro-apoptotic isoforms. Finally, we provide evidence that E2F1 promotes the accumulation of SC35 in cells treated with DNA-damaging agents, and show that SC35 is required for induction of apoptosis in this setting. Taken together, these results demonstrate that E2F1 and SC35 proteins control pre-mRNA processing events to promote apoptosis.

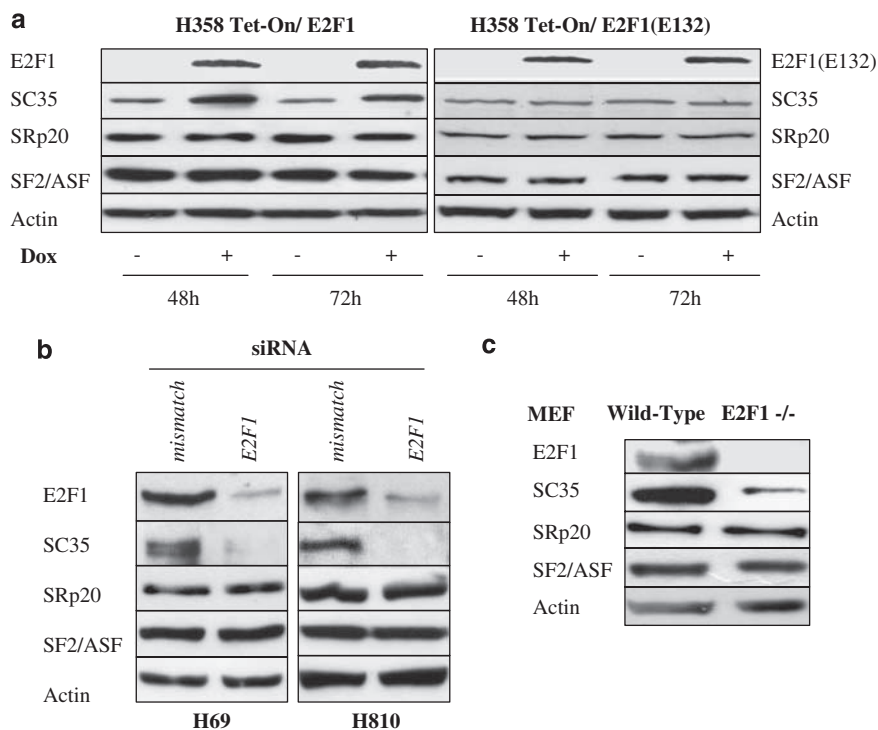
## Results

**E2F1 upregulates SC35 protein expression.** We previously established a model of stable E2F1-inducible clones in the H358 cell line derived from a human lung adenocarcinoma.<sup>11</sup> Here, we exploit this model to test whether E2F1 can control the expression pattern of three members of the SR protein family, one of the most important class of splicing regulators, namely SC35, SRp20 and SF2/ASF. Immunoblotting experiments demonstrated a 3 to 4-fold increased expression of SC35 in cells overexpressing E2F1, whereas the total level of SRp20 and SF2/ASF was not affected (Figure 1a, left panel). This effect required the DNA-binding activity of E2F1 as overexpression of an E2F1(E132) DNA-binding defective mutant did not affect SC35 protein level (Figure 1a, right panel).

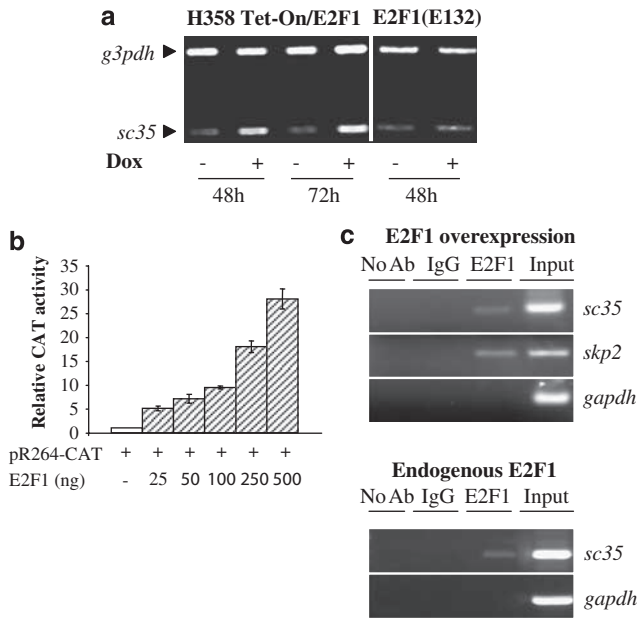
To confirm these data, we knocked down E2F1 expression by using small interfering RNAs (siRNAs) in the H69 and H810

neuroendocrine lung carcinoma cell lines that physiologically express high levels of E2F1, and analyzed SC35, SRp20 and SF2/ASF expression by western blotting. As shown in Figure 1b, the silencing of E2F1 was accompanied by marked downregulation of the endogenous SC35 protein in both cell lines as compared with cells transfected with *mismatch* siRNA. In contrast, the expression of SRp20 and SF2/ASF proteins was not affected. In addition, we observed that SC35 protein levels were strongly reduced in E2F1 knockout murine embryonic fibroblast (MEF) as compared with wild-type MEF, whereas those of SRp20 and SF2/ASF did not change (Figure 1c). Taken together, these data demonstrate that SC35 expression is positively regulated by E2F1.

**SC35 is a direct transcriptional target of E2F1.** To test whether E2F1 controls SC35 expression at the transcriptional level, we performed reverse transcription (RT)-PCR experiments using primers localized at the 5'-end of the *sc35* ORF. The data showed that expression of *sc35* mRNA was induced by E2F1 but not by the mutant E2F1(E132) (Figure 2a). To go further, we performed Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) experiments using a pR264-CAT plasmid that contains the 1 kb human *sc35* promoter upstream of CAT cDNA.<sup>12</sup> Co-transfection of H1299 (Figure 2b) or SAOS2 (data not shown) cells with pR264-CAT vector and increasing amounts of an E2F1 expression vector resulted in a dose-dependent increase of CAT activity. These results indicated that E2F1 can transactivate the promoter of *sc35*.

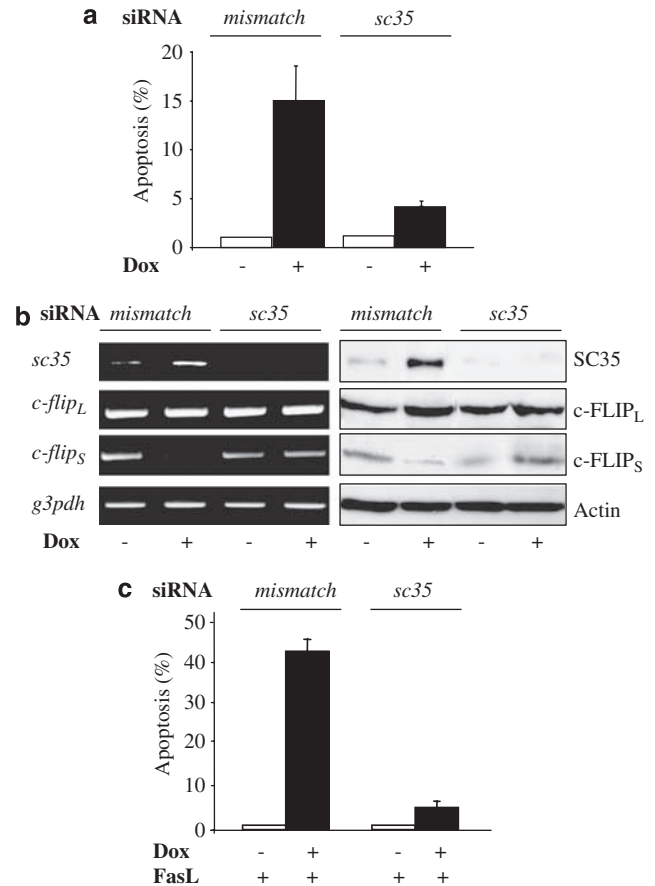


**Figure 1** SC35 is upregulated following E2F1 induction. (a) H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1(E132) cells were incubated for indicated times in the presence (+) or absence (-) of 1  $\mu$ g/ml doxycycline (Dox). Mutant E2F1(E132) is unable to bind DNA. Expression of E2F1, SC35, SRp20 and SF2/ASF proteins was studied by western blotting. Actin was used as a loading control. (b) H69 and H810 neuroendocrine lung carcinoma cell lines were transfected for 72 h with *mismatch* or *e2f1* siRNAs as indicated and subjected to western blot analyses for the detection of E2F1, SC35, SRp20 and SF2/ASF proteins. Actin was used as a loading control. (c) Western blot analyses of E2F1, SC35, SRp20 and SF2 protein expression in E2F1-deficient (E2F1<sup>-/-</sup>) and wild-type control Murine Embryonic Fibroblasts (MEFs). Actin was used as a loading control



**Figure 2** SC35 is a direct transcriptional target of E2F1. (a) RT-PCR analysis of *sc35* mRNA. H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1 (E132) cells were incubated for 48 or 72 h in the presence (+) or absence (-) of 1  $\mu$ g/ml doxycyclin (Dox) as indicated. Total RNAs were extracted as described in the Material and Methods section. Amplified *g3pdh* was used as an internal control. (b) Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) experiments were performed in the H1299 cell line co-transfected for 48 h with 1  $\mu$ g pR264CAT plasmid, encoding CAT under the control of the *sc35* promoter, and increasing amounts of pCMV-E2F1 as indicated. The CAT activity obtained in cells transfected with pR264CAT alone was normalized to 1 and a relative CAT activity was then calculated for each condition. Representative data of at least three independent experiments performed in duplicate are shown. (c) Upper panel: H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence of doxycyclin for 48 h were processed for ChIP analysis using C-20 antibody for E2F1. The coprecipitated chromatin DNA was analyzed by semiquantitative PCR using pair of primers that amplify the human *sc35*, *skp2* or *Gapdh* promoter respectively, as described in the Material and Methods section. IgG was used as an irrelevant antibody. No Ab means that no antibody was used in this case. Input lane corresponds to PCRs containing 1% of total amount of chromatin used in immunoprecipitation reactions. As compared to input amount, 0.13 and 0.3% of chromatin was immunoprecipitated by E2F1 antibody at the *sc35* and *skp2* promoters respectively. Lower panel: Similar ChIP analyses were performed in H1299 cells to detect the binding of endogenous E2F1 to the *sc35* promoter. The input control corresponds to 0.7% of the amount of chromatin used per immunoprecipitation. As compared to input amount, 0.035% of chromatin was immunoprecipitated by E2F1 antibody

To confirm these data *in vivo*, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments in the H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence of doxycyclin (Figure 2c, upper panel). As a positive control of ChIP assays, we used the proximal human *Skp2* promoter that was recently reported as a target of E2F1.<sup>13</sup> In our conditions, binding of E2F1 to the proximal *Skp2* gene promoter was clearly detected whereas no binding was observed with the *Gapdh* promoter (Figure 2c, upper panel). Importantly, the *sc35* promoter fragment (-296/-79) that encompasses two putative E2F1-binding sites was precipitated by an anti-E2F1 antibody (Figure 2c, upper panel). To confirm that SC35 was a direct target of E2F1, endogenous E2F1 was immunoprecipitated from H1299 cells and ChIP experiments were performed. As shown (Figure 2c, lower panel),



**Figure 3** SC35 is required for E2F1-induced apoptosis. H358 Tet-On/E2F1 cells were cultured in the presence (+) or absence (-) of doxycyclin for 72 h. (a) H358 Tet-On/E2F1 cells were transfected for 72 h either with *mismatch* or *sc35* siRNA. Apoptosis was evaluated using Hoechst staining. Results shown are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. (b) H358 Tet-On/E2F1 cells were transfected for 72 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA and subjected to RT-PCR (left panel) and western blot (right panel) analyses. (c) H358/Tet-On/E2F1 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA, cultured with (+) or without (-) doxycyclin as indicated, and treated or not with 25 ng/ml FasL for 20 additional hours. Apoptosis was evaluated as in (a)

endogenous E2F1 clearly bound to the *sc35* promoter in these cells. Taken together, these results identify *sc35* as a direct transcriptional target of E2F1.

**E2F1 promotes SC35-dependent apoptosis through modulation of FLIP<sub>long</sub>/FLIP<sub>short</sub> ratio.** As we previously demonstrated the ability of E2F1 to induce apoptosis through downregulation of the c-FLIP<sub>short</sub> protein isoform,<sup>11</sup> we next analyzed whether SC35 has a function in this setting. By the use of *sc35* siRNAs and Hoechst staining, we first observed that neutralization of SC35 strongly reduced the number of apoptotic cells in response to E2F1 (Figure 3a). Therefore, these results indicated that SC35 is required for E2F1-induced apoptosis. Importantly, RT-PCR (Figure 3b, left panel) and immunoblot analyses (Figure 3b, right panel) revealed that downregulation of both *flip<sub>short</sub>* mRNA and protein levels were also prevented in these conditions. A high level of both c-FLIP protein isoforms has been found in many

tumor cells and was correlated with resistance to FAS- and TRAIL-induced apoptosis, two death receptor ligands.<sup>14</sup> Consistently, we previously reported that the down-regulation of c-FLIP<sub>Short</sub> by E2F1 was sufficient to restore the sensitivity of tumor cells to these ligands.<sup>11</sup> In this study, we showed that neutralization of *sc35* expression overrode the ability of E2F1 to sensitize H358 cells to FasL (Figure 3c) as well as to TRAIL (data not shown) treatments. Collectively, our data demonstrate that E2F1 induces apoptosis through SC35-dependent modulation of the FLIP<sub>Long</sub>/FLIP<sub>Short</sub> ratio, at the expense of the FLIP<sub>Short</sub> protein isoform.

**E2F1 and SC35 co-regulate the splicing pattern of *caspase-8*, *caspase-9* and *Bcl-x* pre-mRNAs in favor of pro-apoptotic splice variants.** As the expression of numerous apoptotic genes is regulated by pre-mRNA alternative splicing,<sup>5</sup> we undertook a series of experiments to test whether E2F1 and SC35 can also affect the ratio of other apoptotic splice variants. Various *caspases* are subjected to alternative splicing. Alternative splicing of *casp-2* proceeds through selective insertion or removal of exon 9 giving rise to anti-apoptotic caspase-2S and pro-apoptotic caspase-2L isoforms respectively.<sup>7</sup> The use of a distant splice donor site at the 3'-end of exon 8 of human *caspase-8* pre-mRNA leads to the synthesis of an alternative splice variant, *caspase-8L*, a competitive inhibitor of caspase-8.<sup>15–16</sup> The inclusion or exclusion of an exon cassette in *caspase-9* causes the expression of two splice variants, namely the pro-apoptotic *caspase-9a* and anti-apoptotic *caspase-9b*.<sup>17–18</sup> To assess whether E2F1 induces changes in the alternative splicing profile of these *caspases* pre-mRNAs, RNAs recovered from non-induced or induced H358/Tet-On/E2F1 cells were analyzed by RT-PCR using primers specific for each caspase splice variant (Figure 4a). The results showed that E2F1 increased the expression of pro-apoptotic *caspases-2L*, *-8a* and *-9a* mRNA levels and decreased those of anti-apoptotic *caspases-8L* and *-9b* (Figure 4b). In contrast, these effects were not observed with mutant E2F1(E132). Interestingly, we were unable to detect the *caspase-2S* transcript in our cells. Altogether, these data indicate that E2F1 can switch the splicing pattern of *caspases-8* and *-9* in favor of pro-apoptotic isoforms. Therefore, besides its ability to transactivate *caspases-8* and *-9* genes,<sup>19</sup> E2F1 also controls their alternative splicing.

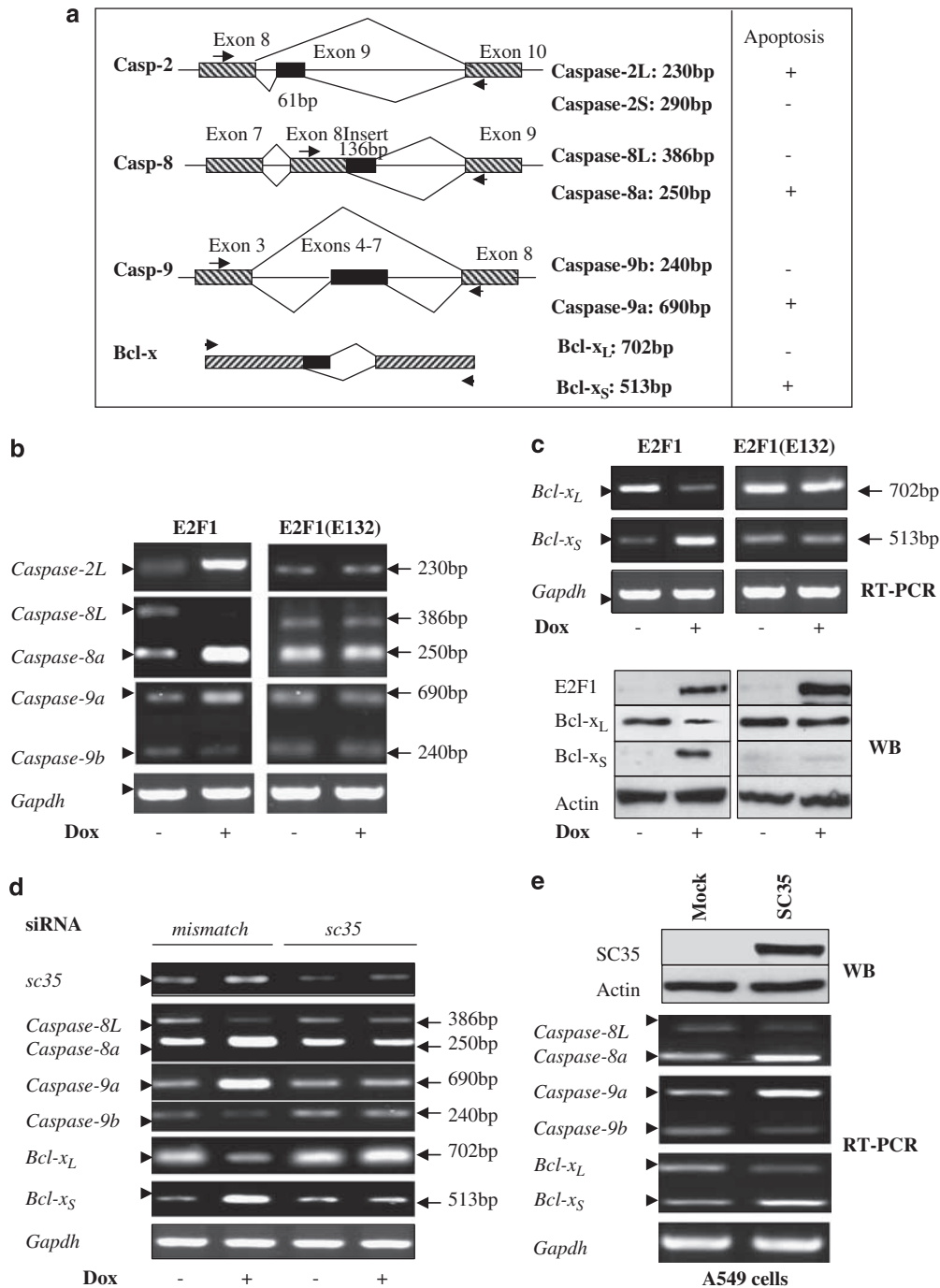
*Bcl-x* is a member of the *bcl-2* gene family that also has a key function in apoptosis. Several splice isoforms of *Bcl-x* have been reported. The use of a 5' proximal site generates the Bcl-x<sub>L</sub> long isoform, which protects cells against apoptosis. In contrast, the use of a 5' distal site results in the synthesis of a short pro-apoptotic Bcl-x<sub>S</sub> isoform.<sup>20</sup> To analyze whether E2F1 regulates the splicing pattern of Bcl-x, we performed RT-PCR analysis with specific primers in H358/Tet-On/E2F1 cells (Figure 4a). The results showed that expression of E2F1 induced a concomitant decrease of Bcl-x<sub>L</sub> and increase of Bcl-x<sub>S</sub> mRNA levels (Figure 4c, upper panel). As was observed for *caspase* regulation, the mutant E2F1(E132) had no effect on *bcl-x* splicing. Western blotting with Bcl-x antibodies specific for each isoform confirmed the RT-PCR results (Figure 4c, lower panel). Therefore, these

data demonstrate that E2F1 also controls the alternative splicing of Bcl-x.

Finally, we investigated whether SC35 was involved in these effects. siRNAs targeting *sc35* were transfected in H358/Tet-On/E2F1 cells, and expression of *caspases* and *Bcl-x* splice variants was analyzed by RT-PCR. In the absence of E2F1 induction, the knockdown of *sc35* using two independent siRNAs (Figure 4d and Supplementary Figure 1) did not significantly alter the level of *caspases-8L*, *-8a*, *-9a* or *-9b* mRNAs, nor that of Bcl-x<sub>L</sub> or Bcl-x<sub>S</sub>. Importantly, the induction of E2F1 expression in these cells deprived of SC35 did not affect the splicing pattern of these genes (Figure 4d and Supplementary Figure 1). Furthermore, when we performed RT-PCR analyses in A549 cells transiently transfected with a vector encoding SC35, we found that overexpression of SC35 affected the splicing profile of *caspase-8*, *-9* and *Bcl-x* pre-mRNAs in a similar way than did E2F1 (compare Figure 4e to b and c) and induced apoptosis (data not shown). Altogether, these results demonstrate that E2F1 requires SC35 to regulate the pre-mRNA alternative splicing of apoptotic genes.

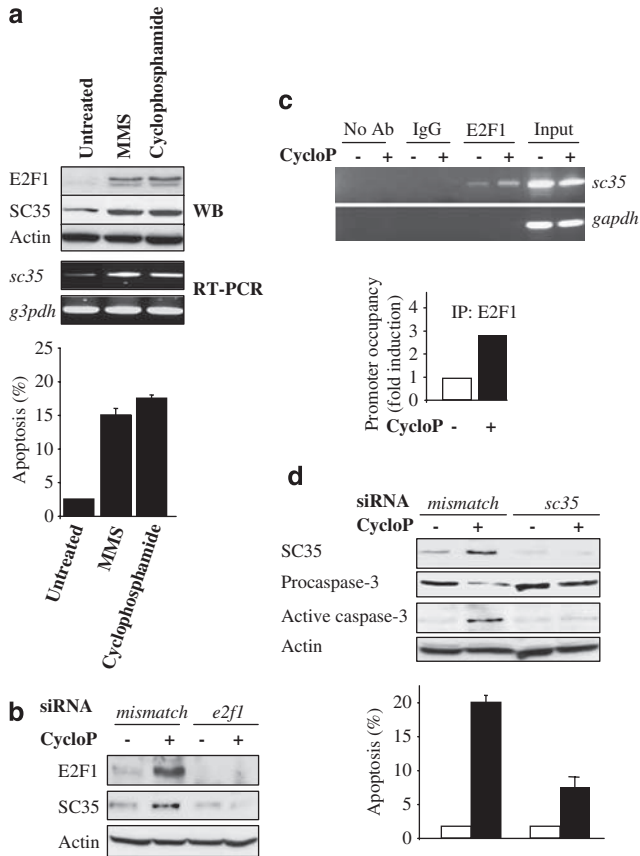
**E2F1 and SC35 proteins are upregulated and required for apoptosis in response to genotoxic stresses.** So far, our results demonstrate the ability of overexpressed E2F1 and SC35 to modify the splicing pattern of various apoptotic genes. Thus, we next attempted to identify in which physiological context both proteins could cooperate to induce apoptosis. It is now well-known that DNA-damaging agents stabilize E2F1 and induce its transcriptional activity towards apoptotic genes thereby causing apoptosis.<sup>21–22</sup> In agreement with previous reports, treatment of H358 cells with either methylmethanesulfonate or cyclophosphamide, two alkylating agents that create inter-strand DNA cross-links, significantly increased E2F1 expression as detected by immunoblotting (Figure 5a, upper panel). In these conditions, upregulation of E2F1 was accompanied by an increase of SC35 protein and mRNA expression (Figure 5a, upper panels), as well as by the induction of apoptosis (Figure 5a, lower panel). In cyclophosphamide-treated cells, the neutralization of E2F1 using siRNAs prevented the accumulation of SC35 (Figure 5b), indicating that E2F1 was involved in SC35 induction. In addition, as detected by ChIP experiments, the binding of endogenous E2F1 to the *sc35* promoter was increased following drug treatment, indicating that SC35 is a direct target of E2F1 in response to DNA-damaging agents (Figure 5c). Furthermore, inhibiting SC35 expression strongly repressed apoptosis following cyclophosphamide treatment, as detected by immunoblotting of pro- or cleaved caspase-3 and Hoechst 33342 staining (Figure 5d). Taken together, these results demonstrate that E2F1 requires SC35 to induce apoptosis in response to genotoxic stresses.

Finally, we analyzed whether E2F1 and SC35 acted through regulation of the alternative splicing of apoptotic genes and studied the expression pattern of *caspases-2*, *-8* and *-9* as well as *Bcl-x* splice variants by RT-PCR following cyclophosphamide treatment. As shown in Figure 6a (left panel), an increase of pro-apoptotic *caspase-9a* and Bcl-x<sub>S</sub> mRNA levels was observed in cyclophosphamide-treated



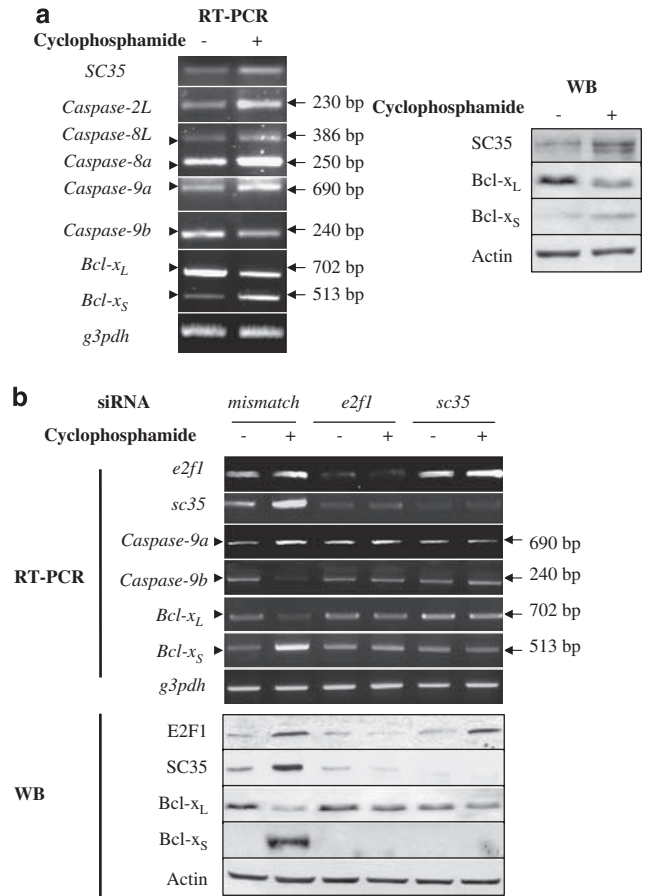
**Figure 4** E2F1 and SC35 cooperate to affect the alternative splicing pattern of *caspase-8*, *caspase-9* and *Bcl-x* pre-mRNAs. (a) Alternative splicing patterns of *caspases-2*, *-8*, *-9* and *Bcl-x* primary transcripts. Coding and alternative exons are indicated by ▨ and ■, respectively. The position of primers, the expected sizes (in nucleotides) and the names of the RT-PCR products corresponding to the different mRNA isoforms are indicated. The ability of each transcript to encode pro-apoptotic (+) or anti-apoptotic (-) protein isoform is depicted on the right. (b, c) H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1(E132) cells were cultured for 48 h in the presence (+) or absence (-) of doxycyclin, as indicated. Total RNAs were extracted and subjected to RT-PCR analyses using the specific primers depicted in (a). Representative agarose gels of RT-PCR products corresponding to *casp-2*, *casp-8*, *casp-9* and *Bcl-x* splice variants are presented. The position of splice variants (in bp) is shown on the right, and the various splicing isoforms are named on the left of each panel. *g3pdh* was used as an internal control. (c) Lower panel: western blot analysis was performed using specific anti-E2F1, anti-Bcl-x<sub>L</sub> and anti-Bcl-x<sub>S</sub> antibodies. Actin was used as a loading control. Results are representative of three independent experiments. (d) H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence (+) or absence (-) of 1 μg/ml doxycyclin were transfected for 72 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA and processed as in (b). (e) A549 human lung adenocarcinoma cells were transiently transfected for 48 h with 10 μg pcDNA3.1/SC35 or control (Mock) vector and processed as in (b). Upper panel: immunoblot demonstrating the accumulation of SC35 in cells transfected with pcDNA3.1/SC35 as compared with mock transfected cells. Actin was used as a loading control





**Figure 5** E2F1 and SC35 proteins are upregulated in cells undergoing apoptosis in response to DNA damaging agents. **(a)** H358 cells were treated or not for 24 h with the indicated cytotoxic agents (50  $\mu$ M, each) and analyzed for E2F1 and SC35 protein levels by western blotting (upper panel). *sc35* mRNA level was studied by RT-PCR in the same conditions (lower panel). Actin and *g3pdh* were used as internal controls for immunoblotting and RT-PCR experiments, respectively. Apoptosis was evaluated after Hoechst 33342 staining. Results shown are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. **(b)** H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *e2f1* siRNA and treated (+) or not (-) for additional 24 h with cyclophosphamide (50  $\mu$ M). Western blot analyses were performed for E2F1 and SC35 detection. **(c)** Upper panel: H358 cells were treated or not for 24 h with cyclophosphamide (50  $\mu$ M) and ChIP analyses were performed using C-20 antibody for E2F1 and primers specific for the human *sc35* or *Gapdh* promoter respectively. IgG was used as an irrelevant antibody. No Ab means that no antibody was used in this case. The input reaction represents 0.5% of the total chromatin immunoprecipitated for each sample. As compared with input amount, 0.04 and 0.12% of chromatin was immunoprecipitated by E2F1 antibody at the *sc35* promoter level in untreated and treated cells respectively. Lower panel: Bands obtained with E2F1 ChIP DNA samples were quantified and normalized relative to the corresponding input DNA sample. *Sc35* promoter occupancy in non-treated cells was arbitrarily set at 1. **(d)** H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA and treated (+) or not (-) for 24 additional hours with cyclophosphamide (50  $\mu$ M). Apoptosis was evaluated after Hoechst 33342 staining and immunoblotting with anti-caspase-3 or cleaved caspase-3 antibody. Results are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments

cells together with a decrease of anti-apoptotic *caspase-9b* and *Bcl-x<sub>L</sub>* splice variants. Again, immunoblotting experiments confirmed the downregulation and upregulation of *Bcl-x<sub>L</sub>* and *Bcl-x<sub>S</sub>* proteins, respectively (Figure 6a, right panel). In contrast, accumulation of *caspase-2L* and of both anti- and pro-apoptotic *caspase-8L* and *-8a* transcripts was detected in cyclophosphamide-treated cells (Figure 6a, left



**Figure 6** E2F1 and SC35 regulate the alternative splicing pattern of *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs in response to cyclophosphamide treatment. **(a)** H358 cells were treated (+) or not (-) for 24 h with cyclophosphamide (50  $\mu$ M). Left panel: RT-PCR analysis for detection of *caspases -2, -8, -9* and *Bcl-x* splice variants were performed as described earlier in Figure 4b and c. Right panel: western blot analysis was performed using specific anti-SC35, anti-*Bcl-x<sub>L</sub>* and anti-*Bcl-x<sub>S</sub>* antibodies. Actin was used as a loading control. **(b)** H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *e2f1* or *sc35* siRNA and treated (+) or not (-) for 24 additional hours with cyclophosphamide (50  $\mu$ M). RT-PCR (upper panel) and western blot (lower panel) analyses of *Bcl-x* or *caspase-9* splice variants were performed as previously described. *g3pdh* and actin were used as internal controls for RT-PCR and immunoblotting experiments, respectively

panel). Therefore, these results demonstrate that cyclophosphamide modifies the alternative splicing pattern of *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs in favor of pro-apoptotic splice variants. Importantly, the neutralization of either *e2f1* or *sc35* before cyclophosphamide cell treatment prevented these modifications, as detected by RT-PCR (Figure 6b, upper panel) and western blotting (Figure 6b, lower panel). Overall, these data strongly suggest that E2F1 and SC35 proteins act together during apoptosis of DNA-damaged cells by controlling *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs alternative splicing.

## Discussion

E2F1 is a transcription factor that has a critical function in cell cycle progression by favoring entry into S phase. Besides its



function in cell cycle control, E2F1 is also widely accepted as an inducer of apoptosis. It has been well-demonstrated that E2F1 promotes apoptosis through both transcription-dependent and -independent mechanisms. So far, numerous apoptotic genes whose transcription is enhanced by E2F1 have been identified.<sup>10</sup> In this study, we show that E2F1 switches the alternative splicing pattern of key apoptotic genes in favor of their pro-apoptotic splice variants, and identify the SC35 protein, a member of the SR family of splicing regulators, as a key direct target of E2F1. Interestingly, two high throughput studies using ChIP on Chip analysis<sup>23</sup> or DNA microarrays<sup>24</sup> previously suggested that SC35 is an E2F1-regulated gene. In this study, we provide the first evidence of a direct functional link between E2F1 and SC35 proteins to regulate cellular apoptosis. Therefore, besides its ability to transactivate pro-apoptotic target genes, E2F1 is also able to control pre-mRNA processing events to induce apoptosis.

It has now emerged from the literature that splicing not only depends on the interaction of splicing factors with their target pre-mRNAs, but is also coupled to transcription.<sup>25</sup> Indeed, variations of pol II promoter structure can lead to differences in alternative splicing of the transcript<sup>26–27</sup> and components of the spliceosome such as the p54nrb (p54 nuclear RNA-binding protein) and PSF (polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor) RNA-binding proteins are involved in both transcription and splicing processes.<sup>28</sup> (for review). In addition, transcriptional coregulators of the nuclear receptor family recruited at the promoter level not only enhances the transcriptional activity of this promoter, but also affects the nature of the splice variants produced.<sup>28–30</sup> Moreover, some transcription factors have been reported to bind to proteins of the spliceosome and/or display dual functions in splicing and transcription.<sup>31–32</sup> Taken together, these results indicate a function for proteins controlling transcription in splicing regulation. In this study, we demonstrate that the transcription factor E2F1 transactivates the expression of *sc35*, a component of the spliceosome and that both proteins regulate pre-mRNA processing events. Altogether, these results strengthen the connection between the transcriptional and splicing machineries. We show that E2F1 alters the splicing pattern of some of its transcriptional targets such as *c-flip* (Figure 3b), *caspases-8* and *-9* (Figures 4b and d). As an increased level of *caspases-8* and *-9* transcripts was also detected in this context, it is possible that the transactivating functions of E2F1 cooperate with SC35 accumulation to regulate pre-mRNA processing events. Interestingly, the expression of *c-flip* mRNA was apparently not affected by E2F1 in the same conditions (Figure 3a). It was recently shown that the Spi-1/PU.1 transcription factor could modify alternative splicing of a transcriptional target gene, without modulation of its mRNA transcription.<sup>32</sup> Therefore, another but not exclusive possibility is that E2F1 acts as a scaffold protein to drive SC35 to the nascent transcribed RNA of some of its target genes, according to the cell-specific promoter occupation model.<sup>25</sup>

Apoptosis is one of the cellular processes in which alternative splicing has important regulatory functions.<sup>5</sup> Several components of the splicing machinery have already been implicated in apoptotic processes. For example, deple-

tion of SF2/ASF<sup>8</sup> induces apoptosis. In addition, overexpression of SC35 alters the splicing of *caspase-2* mRNA, in favor of the pro-apoptotic isoform accumulation.<sup>7</sup> Furthermore, phosphorylation of SR proteins, which is known to control their sub-cellular localization as well as their activities, has been reported during apoptosis.<sup>6–33</sup> However, the upstream signaling molecules that regulate the expression and/or activity of SR proteins during apoptosis, as well as the endogenous targets of SR proteins in this context remain largely unknown. In this study, we provide evidence that E2F1 triggers apoptosis through SC35 accumulation and we demonstrate that both proteins cooperate to affect the splicing pattern of *caspase-8*, *caspase-9*, *flip* and *bcl-x* genes, in favor of pro-apoptotic splice variants. Taken together, our data identify SC35 as a new mediator of E2F1-induced apoptosis and identify some of its endogenous targets in this setting.

Alteration of alternative splicing is believed to contribute to the resistance of tumor cells to chemotherapy, notably through overexpression of anti-apoptotic splice variants.<sup>34,35</sup> However, the molecular mechanisms involved in such processes remain largely unknown. Importantly, and consistent with a function of SR proteins during the response to DNA damage, it has been previously shown that SC35 accumulates following  $\gamma$ -irradiation.<sup>36</sup> In addition, it was recently reported that the expression of SRp55, another member of the SR protein family, is upregulated and required for apoptosis of p53-deficient cells after mitomycin C treatment.<sup>37</sup> In this study, we demonstrate that SC35 is upregulated by an E2F1-dependent pathway in response to methylmethanesulfonate or cyclophosphamide treatment. Furthermore, we show that the E2F1 and SC35 proteins are required for apoptosis of DNA-damaged cells and control *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs alternative splicing at the expense of anti-apoptotic splice variants. Therefore, our data strongly suggest that E2F1 and SC35 are key determinants of the cellular response to chemotherapeutic agents.

To conclude, we highlight the first functional connection between the transcription factor E2F1 and a component of the splicing machinery, SC35, in the control of cellular apoptosis. It is well-known that abnormalities in E2F-signaling pathways contribute to tumorigenesis.<sup>38</sup> Accordingly, we previously described a differential pattern of E2F1 protein expression in human lung tumors.<sup>39</sup> Interestingly, some SR proteins are overexpressed in ovarian cancer<sup>40</sup> and SF2/ASF was recently assessed as a proto-oncogene in human tumors.<sup>41</sup> Therefore, it remains to be determined whether alterations of both E2F1 and SC35 proteins could cooperate to promote carcinogenesis.

## Materials and Methods

**Cell lines, treatment, apoptotic assay, plasmids and transfection.** A549, H358, H1299 and H69 human lung carcinoma cell lines were cultured as described earlier.<sup>42</sup> The H810 large cell neuroendocrine lung carcinoma cell line was cultured in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 5% (v/v) FCS, 0.005 mg/ml insulin, 0.01 mg/ml transferrin, 30 nM sodium selenite, 10 nM hydrocortisone, 10 nM  $\beta$ -estradiol and 10 mM HEPES. MEFs wild-type and E2F1<sup>-/-</sup> were cultured in DMEM (GIBCO) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS. The human lung adenocarcinoma H358/Tet-On/E2F1 and Tet-On/E2F1 (E132) inducible clones were obtained as previously described.<sup>11</sup> Apoptosis was evaluated by scoring the percentage of apoptotic cells on 500 cells after Hoechst 33342 staining. Transient transfections were carried out using Fugene 6

**Table 1** Sequences of forward and reverse primers as well as PCR conditions used in this study

Primer sequences	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')
sc35	CCACTCAGAGCTATGAGCTACG 94 °C for 30 s; 57 °C for 45 s; 72 °C for 1 min; 30 cycles	ACTCCTTGGTGTAGCGATCC
FLIP <sub>short</sub>	CGAGGCAAGATAAGCAAGGA 94 °C for 30 s; 58 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 30 cycles	CACATGGAACAATTTCCAAGAA
FLIP <sub>long</sub>	CTTGGCCAATTTGCCTGTAT 94 °C for 30 s; 58 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 30 cycles	GGCAGAACTCTGCTGTTCC
Caspase-2	TTACCTGCACACCGAGTCAC 94 °C for 30 s; 64 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 28 cycles	TGGTTCCTTCCATCTTGTGGTC
Caspase-8	GGGATACTGTCTGATCATCAAC 94 °C for 30 s; 55 °C for 30 s; 72 °C for 1 min; 32 cycles	GGAGAGGATACAGCAGATGAA
Caspase-9	AGACCAGTGGACATTGGTTC 94 °C for 30 s; 59 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 30 cycles	GGTCCCTCCAGGAAACAAA
Bcl-x	ATGTCTCAGAGCAACCGGA 94 °C for 1 min; 54 °C for 1 min; 72 °C for 1 min; 25 cycles	TCACTTCGACTGAAGAGTG
e2f1	TCTCCCCAGAACCGCTGTTT 94 °C for 30 s; 60 °C for 1 min; 72 °C for 1 min; 25 cycles	CGAAGTGGTAGTCGAGGGC

(Roche Diagnostic). Plasmids used in transient transfections were pcDNA3, pCMV-E2F1, pcDNA3-HA-SC35 and pR264-CAT. Recombinant soluble human FLAG-tagged FasL was purchased from Alexis (San Diego, CA, USA). Methanesulfonic acid methyl ester and cyclophosphamide monohydrate were all purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

**Antibodies.** The anti-E2F1 (C-20), anti-SC35 (H-55) and anti-Bcl-x<sub>L</sub> (H5) antibodies were purchased from Santa Cruz, the anti-Bcl-x<sub>S</sub> (Ab-1) from Oncogene Research, the anti-E2F1 (KH95) and anti-procaspase-3 from Pharmingen, the anti-FLIP (NF6) from Alexis, the anti-actin (20–33) from Sigma, the anti-SC35 (4F-11) from Euromedex and the anti-SRP20 (7B4) and anti-SF2/ASF from Zymed. Cleaved caspase-3 (Asp175) was from Cell Signaling.

**CAT assays.** For CAT assay measurements,  $2 \times 10^5$  cells per well were seeded in duplicate in 6-well plates, and transfected with the pR264CAT plasmid in the presence or absence of increasing amounts of pCMV-E2F1 vector. pR364CAT vector contains the 1 kb human sc35 promoter<sup>12</sup> and encompasses two putative E2F1-binding sites at –170 (TTTGCCCG) and –236 (TTTCGCGG) bp upstream of the transcription start site. Transfection was performed using Fugene 6 according to the manufacturer's instructions, and CAT activity was measured 24–48 h after transfection using CAT ELISA (Roche Diagnostic). CAT activity was then normalized in each sample according to the protein amount.

**Chromatin immunoprecipitation experiments.** Chromatin immunoprecipitation experiments were performed in H358 cells, H1299 cells or H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence of 1 μg/ml doxycyclin for 24 h. An equal amount of chromatin (25 μg) was precleared and immunoprecipitated with a polyclonal antibody specific for E2F1 (C-20, Santa Cruz) or unrelated rabbit IgG or no antibody, overnight at +4 °C. Co-immunoprecipitated chromatin was analyzed for the presence of sc35 promoter DNA between –296 and –79 bp, upstream of the sc35 transcription start site, by semiquantitative PCR. This fragment encompasses two putative E2F1-binding sites at –170 and –236 bp upstream of the transcription start site. The primers used were as follow: forward 5'-GAGCACCTCTCTT CCTCCTG-3' and reverse 5'-CCGAAATGAAACCTTCTGA-3'. PCR conditions were 94 °C for 3 min, (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s) for 36 cycles, and 72 °C for 10 min. For Skp2 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) promoter analysis, the specific primers used were SKP2-95 5'-CTCCCGC CTACCCCGTGG-3', SKP2- +135 5'-CAGACCCGCTAAGCCTAGCAACG-3', GAPDH forward 5'-AGCTCAGGCTCAAGACCTT-3' and GAPDH reverse 5'-AA GAAGATGCGGCTGACTGT-3' as previously described.<sup>13</sup> PCR conditions were 94 °C for 3 min, (94 °C 30 s, 57 °C for GAPDH or 63 °C for Skp2 30 s, 72 °C 30 s) for 36 cycles, and 72 °C for 10 min. Signals obtained on ethidium bromide-stained gels were quantified using ImageJ software and each ChIP DNA sample was normalized according to the corresponding input DNA sample.

**Transfection of siRNA oligonucleotides.** The sequences designed to specifically target human sc35 and e2f1 RNAs were as follows: sc35(1): 5'-GCG

UCUUCGAGAAGUACGGTT-3'; sc35(2): 5'-UCGUUCGCUUUCACGACAATT-3'; e2f1(1): 5'-GUCACGCUAUGAGACCUCATT-3'; e2f1(2): 5'-ACAAGGCCCGAUC GAUGUUTT-3'. The second siRNA targeting sc35 was from Invitrogen (Stealth Select RNAi, SFRS2, Invitrogen). The scrambled siRNA oligonucleotides used as control for all RNA interference experiments were as follows: 5'-UCGGCUCUUA CGCAUUC AATT-3' and 5'-CAAGAAAGGCCAGUCCAAGTT-3'. Cells were transfected with siRNA oligonucleotides duplex using Oligofectamine reagent according to the manufacturer's instruction (Invitrogen). Doxycyclin (1 μg/ml) was added or not in the culture medium 4 h after transfection. The cells were analyzed 48 or 72 h post-transfection. For experiments with cyclophosphamide, cells were transfected for 48 h with *mismatch*, *sc35* or *e2f1* siRNAs, then cyclophosphamide (50 μM) was added in the culture medium for 24 additional hours.

**RT-PCR analyses of alternative splice transcripts.** Total cellular RNAs were isolated using Trizol reagent (Invitrogen). In all conditions, 1 μg of total RNA was reverse transcribed using oligo(dT) primer and MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The different primer sequences used in this study as well as the PCR conditions are recapitulated in Table 1. Amplification of a cDNA fragment of G3PDH (Invitrogen) was performed in the same PCR as an internal control. PCR products were run on a 1–2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

**Immunoblotting and immunoprecipitation experiments.** Immunoblotting experiments were performed as described earlier.<sup>11</sup>

**Acknowledgements.** We thank Patricia Betton, Pascal Perron and Celine Lampreia for technical assistance. We thank Johann Soret (IGM, Montpellier) for the pECE-SC35HA and Alain Sureau (CGM, Gif sur Yvette) for pR264-CAT plasmids. We thank Didier Auboeuf, Martin Dutertre, Saadi Khochbin, Johann Soret and Jamal Tazi for encouraging discussions and critical reading of this paper. We thank Mary Callanan (INSERM U823) for help with editing. This work was supported by grants from the region Rhône Alpes (Thématique Prioritaire Cancer and Canceropole 2003: Oncocell, Epimed and INACancer), by the Ligue contre le Cancer (Comité de Savoie), by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée), by INCA (PNES, Programme National d'Excellence Spécialisé 2005) and by the Conseil Scientifique National d'AGIR à dom. Arnaud van den Broeck was supported by a fellowship from the French Research Ministry. Galina Merdzhanova was supported by fellowships from the French Research Ministry and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Valerie Edmond was supported by a grant from the Conseil Scientifique National d'AGIR à dom. Sandrine De Seranno was supported by a grant from INCA.

- Smith CW, Valcarcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 381–388.
- Sanford JR, Ellis J, Caceres JF. Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing. *Biochem Soc Trans* 2005; **33**: 443–446.

3. Spector DL, Fu XD, Maniatis T. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J* 1991; **10**: 3467–3481.
4. Sanford JR, Longman D, Caceres JF. Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Prog Mol Subcell Biol* 2003; **31**: 33–58.
5. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2005; **19**: 1–13.
6. Utz PJ, Hottellet M, van Venrooij WJ, Anderson P. Association of phosphorylated serine/arginine (SR) splicing factors with the U1-small ribonucleoprotein (snRNP) autoantigen complex accompanies apoptotic cell death. *J Exp Med* 1998; **187**: 547–560.
7. Jiang ZH, Zhang WJ, Rao Y, Wu JY. Regulation of lch-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 9155–9160.
8. Li X, Wang J, Manley JL. Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes Dev* 2005; **19**: 2705–2714.
9. Wang J, Takagaki Y, Manley JL. Targeted disruption of an essential vertebrate gene: ASF/SF2 is required for cell viability. *Genes Dev* 1996; **10**: 2588–2599.
10. DeGregori J, Johnson DG. Distinct and overlapping roles for E2F family members in transcription, proliferation and apoptosis. *Curr Mol Med* 2006; **6**: 739–748.
11. Salon C, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C *et al*. E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* 2006; **13**: 260–272.
12. Sureau A, Soret J, Vellard M, Crochet J, Perbal B. The PR264/c-myc connection: expression of a splicing factor modulated by a nuclear protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **89**: 11683–11687.
13. Reichert M, Saur D, Hamacher R, Schmid RM, Schneider G. Phosphoinositide-3-kinase signaling controls S-phase kinase-associated protein 2 transcription via E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2007; **67**: 4149–4156.
14. Tschopp J, Irmiler M, Thome M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**: 552–558.
15. Eckhart L, Henry M, Santos-Beneit AM, Schmitz I, Krueger A, Fischer H *et al*. Alternative splicing of caspase-8 mRNA during differentiation of human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **289**: 777–781.
16. Himeji D, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hayashi K, Watanabe T, Harada M. Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood* 2002; **99**: 4070–4078.
17. Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL, Wood RE, Obeid LM, Ogretmen B *et al*. *De novo* ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 2002; **277**: 12587–12595.
18. Massiello A, Chalfant CE. SRp30a (ASF/SF2) regulates the alternative splicing of caspase-9 pre-mRNA and is required for ceramide-responsiveness. *J Lipid Res* 2006; **47**: 892–897.
19. Nahle Z, Polakoff J, Davuluri RV, McCurrach ME, Jacobson MD, Narita M *et al*. Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 859–864.
20. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA *et al*. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; **74**: 597–608.
21. Stevens C, Smith L, La Thangue NB. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 401–409.
22. Wang C, Chen L, Hou X, Li Z, Kabra N, Ma Y *et al*. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 1025–1031.
23. Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA *et al*. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 2002; **16**: 245–256.
24. Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E *et al*. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 2001; **15**: 267–285.
25. Kornbliht AR. Promoter usage and alternative splicing. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 262–268.
26. Cramer P, Pesce CG, Baralle FE, Kornbliht AR. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 11456–11460.
27. Cramer P, Caceres JF, Cazalla D, Kadener S, Muro AF, Baralle FE *et al*. Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell* 1999; **4**: 251–258.
28. Auboeuf D, Dowhan DH, Dutertre M, Martin N, Berget SM, O'Malley BW. A subset of nuclear receptor coregulators act as coupling proteins during synthesis and maturation of RNA transcripts. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 5307–5316.
29. Auboeuf D, Dowhan DH, Kang YK, Larkin K, Lee JW, Berget SM *et al*. Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2270–2274.
30. Auboeuf D, Dowhan DH, Li X, Larkin K, Ko L, Berget SM *et al*. CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 442–453.
31. Chansky HA, Hu M, Hickstein DD, Yang L. Oncogenic TLS/ERG and EWS/Flt-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. *Cancer Res* 2001; **61**: 3586–3590.
32. Guillouf C, Gallais I, Moreau-Gachelin F. Spi-1/PU.1 oncoprotein affects splicing decisions in a promoter binding-dependent manner. *J Biol Chem* 2006; **281**: 19145–19155.
33. Kamachi M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, Anderson P, Utz PJ. Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *J Exp Med* 2002; **196**: 1213–1225.
34. Mercatante D, Kole R. Modification of alternative splicing pathways as a potential approach to chemotherapy. *Pharmacol Ther* 2000; **85**: 237–243.
35. Hayes GM, Carrigan PE, Beck AM, Miller LJ. Targeting the RNA splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2006; **66**: 3819–3827.
36. Cardoso RS, Espanhol AR, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. Differential gene expression in gamma-irradiated BALB/3T3 fibroblasts under the influence of 3-aminobenzamide, an inhibitor of parp enzyme. *Mutat Res* 2002; **508**: 33–40.
37. Filippov V, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. The early response to DNA damage can lead to activation of alternative splicing activity resulting in CD44 splice pattern changes. *Cancer Res* 2007; **67**: 7621–7630.
38. Johnson DG, Degregori J. Putting the oncogenic and tumor suppressive activities of E2F into context. *Curr Mol Med* 2006; **6**: 731–738.
39. Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene* 2001; **20**: 1678–1687.
40. Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB, Watermann DO, Kieback DG, Stamm S *et al*. Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 2004; **11**: 1085–1090.
41. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 2007; **14**: 185–193.
42. Salon C, Merdzhanova G, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B. E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors. *Oncogene* 2007; **26**: 6927–6936.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

## IV. ARTICLE 4

### **SC35 mediates E2F1-dependent cell cycle control in S phase.**

Valerie Edmond<sup>1,2</sup>, Galina Merdzhanova<sup>1,2,§</sup>, Christian Brambilla<sup>1,2</sup>, Elisabeth Brambilla<sup>1,2</sup>, Sylvie Gazzeri<sup>1,2</sup> and Beatrice Eymin<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, 38042, France.

<sup>2</sup> Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, 38041, France.

Running title: SC35 controls E2F1-dependent cell cycle proliferation

§ Present address: INSERM, U878, CEA iRTSV/LAPV, Grenoble, 38054, France

\* Corresponding author:

Dr. Beatrice Eymin

INSERM U823

Equipe 2: Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon

Institut Albert Bonniot, BP170

38042 Grenoble Cedex 09, FRANCE

Tel: +33 4 76 54 94 76 / Fax: +33 4 76 54 94 13

email: [Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr](mailto:Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr)

To whom requests for reprints should be addressed

## Abstract

The transcription factor E2F1 belongs to the E2F family. It plays a crucial role in driving cell cycle progression in S phase as well as in inducing apoptosis. Ser/Arg-Rich (SR) proteins are a family of RNA-binding phosphoproteins that control both constitutive and alternative pre-mRNA splicing events. While activities of these proteins on splicing have been well-studied *in vitro*, less is known about their functions in the control of essential biological processes such as cellular proliferation. We previously demonstrated that SC35, a member of SR proteins family, regulates E2F1-mediated apoptosis. In this study, we postulated that SC35 could also be involved in the proliferative functions of E2F1. We provide evidence that SC35 is a cell-cycle regulated protein. We further demonstrate that SC35 regulates the entry and progression into S phase by controlling some E2F1-target genes involved in this setting, such as cyclin E. At the molecular level, we show that SC35 interacts with E2F1 and stimulates its transcriptional function. In addition, we show that the PI3K/AKT signaling pathway is involved in the control of cyclin E expression mediated by both E2F1 and SC35 proteins, notably through the phosphorylation of SC35. In agreement with such an important role of this network during lung carcinogenesis, we finally describe a direct correlation between cyclin E and P-SC35 protein expression in a series of neuroendocrine lung tumors. Taken together, these results unravel a new function of SC35 in the control of the cell cycle progression through its closed interplay with E2F1.

## Introduction

A central aspect of development and disease such as cancer is the control of cellular proliferation through regulation of the cell cycle. A key step in this regulation is the transition from the G1 to S phase of the cell cycle. This critical passage is tightly coupled to the transcriptional control of genes involved in growth and DNA replication. In mammalian cells, this temporal control is performed mostly by the E2F family of transcription factors (Blais & Dynlacht, 2004; Dimova & Dyson, 2005, for review). E2F transcription factors, originally identified as activators of adenovirus transcription, are heterodimeric transcription factors that consist of one member from the E2F protein family, called E2F1-E2F8, and another member from the DP protein family, called DP1 and DP2. E2Fs are classified into different groups based on domain conservation and transcriptional activity (DeGregori & Johnson, 2006, Johnson & Degregori, 2006, for reviews). Among the E2F1-E2F5 proteins, E2F1, E2F2 and E2F3a primarily activate transcription, whereas E2F3b, E2F4, and E2F5 primarily repress transcription (Harbour & Dean, 2000, for review). It is now well-known that the interaction of E2F1-3 proteins with members of the retinoblastoma (Rb) "pocket" protein family pRb, p107 and p130 inhibits E2Fs transcriptional activity in quiescent or early G1 phase of the cell cycle. As cells progress through the G1 phase, Rb is sequentially phosphorylated by Cdks, causing the release of the activator E2Fs and the transcriptional activation of genes important for passage in S phase (Harbour & Dean, 2000, for review). Given the role of Rb pathway mutations and, thus, E2Fs deregulation in human cancer, the characterization of additional partners of E2Fs involved in the control of cellular proliferation is critical to improve our knowledge regarding the contribution of each of these E2Fs to the tumorigenic process.

The SR protein family comprises a number of phylogenetically conserved and structurally related proteins that play a crucial role in the control of constitutive and alternative pre-mRNA splicing. Members of the SR family have a modular structure containing one or two copies of an RRM (RNA Recognition Motif) at the N-terminus that provides RNA-binding specificity and a C-terminal RS domain that acts to promote protein-protein interactions and facilitates the recruitment of the spliceosome. All SR proteins null mice display an early embryonic phenotype (Jumaa et al, 1999; Wang et al, 2001; Ding et al, 2004). Therefore, these *in vivo* findings indicate that SR proteins are not redundant and are absolutely required for cell viability and/or animal development. Interestingly, some recent evidences have linked

SR proteins to the control of cellular proliferation. For instance, in mouse embryonic fibroblasts (MEFs), the loss of SC35, a member of SR proteins family, induces a cell cycle arrest in G2, through the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21<sup>WAF1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> (Xiao et al, 2007). In addition, in *Drosophila*, the SR protein B52 maintains a G1/S block through the stimulation of the repressive function of dE2F2 (Rasheva et al, 2006). Moreover, in response to SR protein reduction, the S phase entry of SV40-immortalized MEF declines (Lin et al, 2005). Taken together, these data highly support a role of SR proteins in the regulation of components of the cell-division machinery, albeit the molecular mechanisms involved in this setting remain largely unknown.

We recently provided the first evidence that the SR protein SC35 is a new transcriptional target of E2F1 in various human lung carcinoma cell lines (Merdzhanova et al, 2008). Furthermore, we demonstrated that both proteins cooperate to control apoptosis in response to genotoxic stresses, by switching the alternative splicing pattern of *caspases-8*, *-9* and *Bcl-x* towards the expression of pro-apoptotic isoforms. These results demonstrated that E2F1 and SC35 proteins control pre-mRNA processing events to promote apoptosis. In this study, we asked whether SC35 could also contribute to the proliferative functions mediated by E2F1.

## Materials and Methods

### Cell lines, cell treatments, plasmids and transfection

H1299, H810, H69 human lung carcinoma cell lines were cultured as described previously (Salon et al, 2006; Merdzhanova et al, 2008). Transient transfections were carried out using Fugene 6 (Roche Diagnostic, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. Plasmids used in transient transfections were pcDNA3.1, pcDNA3.1-SC35, pCMV-E2F1, pGLuc, pGL2-cyclin E encoding the luciferase protein under the control of the cyclin E promoter, Skp2-luc encoding the luciferase under the control of the human Skp2 promoter region spanning from -272 to +244 residues and pCMV-DP1. An inducible E2F-responsive construct encoding the firefly luciferase reporter gene under the control of a basal promoter element (TATA box) joined to tandem repeats of a specific E2F Transcription Response Element (TRE) was purchased from SuperArray (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France), and an E2F reporter construct harboring E2F-binding site consensus sequences from Qiagen

(Courtaboeuf, France). Hydroxyurea and wortmannin were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) and LY294002 from Ozyme (Saint Quentin Yvelines, France). BrdU solution was purchased from Roche. For synchronisation of cells, 1 mM hydroxyurea was added to 30% confluent H1299 cells for 18 h. Cells were then washed twice with PBS, released in hydroxyurea free complete medium and collected at the indicated time points after block release. For the double block of thymidine, 30% confluent U2OS cells were treated with 2.5 mM thymidine for 17 hours, then washed three times in PBS and released in thymidine free complete medium for 8 h. Thymidine was added again at 2.5 mM for 17 h. Cells were released and collected at the indicated time points.

### Antibodies

The antibodies anti-E2F1 (KH95) and anti-SC35 (H55) were purchased from Santa Cruz (Heidelberg, Germany), the anti-cyclin A (C-22) from Tebu-Bio (Le Perray en Yvelines, France), the anti-DHFR from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), the anti-actin (A2066) and anti-tubulin (B512) from Sigma, the anti-SC35 (4F11) from Euromedex (Souffelweyersheim, France), the anti-p45<sup>SKP2</sup> from Zymed (Invitrogen, Cergy Pointoise, France), the anti-phosphorylated SC35, anti-thymidylate synthase and anti-DNA polymerase  $\alpha$  from Abcam (Paris, France), and the anti-HA.11 from Covance. The anti-p21<sup>WAF1</sup> (Ab-1) was from Calbiochem, and the antibodies anti-AKT Pan, anti-phosphorylated AKT (S473) and anti-phosphorylated H2AX (S139) from Cell Signaling (Ozyme). The FITC-conjugated BrdU antibody was purchased from Roche. Immunoprecipitation and western blotting experiments were performed as previously described (Salon et al, 2006).

### Transfection of siRNA oligonucleotides

The sequences designed to specifically target human *sc35* RNAs were purchased from Eurogentec (Angers, France) and were as follows: 5'-UCGAAGUCUCGGUCCCGCACUCG-3' and 5'-GAGGACGCUAUGGAUGCCAUGGACG-3'. The *mismatch* siRNA oligonucleotide used as a control was 5'-UCGGCUCUUACGCAUUCAA-3'. Cells were transfected with siRNA oligonucleotides duplex using Oligofectamine reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The cells were analyzed 72 hours post-transfection.



### **Isolation of chromatin-enriched fraction**

Nuclear fraction was isolated as previously described (Edmond et al, submitted). The chromatin-enriched fraction (CEF) was then isolated by re-suspending cell nuclei in an ice-cold hypotonic buffer (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA and 1 mM DTT; pH=7.85) supplemented with protease inhibitor cocktail. Soluble fraction was removed and the pellet (CEF) was washed twice in hypotonic buffer. The CEF was re-suspended and sonicated in a sonication buffer (10 mM Tris, 10% sucrose, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.4) supplemented with protease inhibitor cocktail.

### **FACS analyses**

For DNA content analysis, cells were fixed with 70% cold ethanol for 30 min on ice, treated with RNase A (20 µg/ml) for 20 min and stained with propidium iodide (10 µg/ml). Flow cytometric analysis of 10000 cells was performed on a FACScan flow cytometer (BD Biosciences) and data were recovered using the CellQuest software (BD Biosciences). For BrdU incorporation measurements, cells were pulsed with 100 µM BrdU for 20 min, before harvesting. Cells were collected and fixed in 70% cold ethanol for 30 min on ice, then denatured in 4N HCl for 30 min at room temperature, washed in PBS containing 0.5% Tween 20 and incubated with FITC-conjugated BrdU antibody in PBS containing 0.1% BSA for 30 min. Cells were washed in PBS, stained with Propidium Iodide (PI) and analyzed by flow cytometry.

### **RT-PCR and RT-qPCR**

Total cellular RNAs were isolated using Trizol reagent (Invitrogen). For RT-PCR experiments, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using oligo(dT) primer and MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. RT reaction (3 µl) was then amplified by PCR for 30 cycles using the following conditions: 94°C for 30 s; 57°C for 45 s; 72°C for 1 min. The primer sequences used in this study were as follows: *sc35* forward: 5'-CCA-CTC-AGA-GCT-ATG-AGC-TAC-G-3'; *sc35* reverse: 5'-ACT-CCT-TGG-TGT-AGC-GAT-CC-3'. Amplification of a fragment of the cDNA of *g3pdh* (Invitrogen) was performed in the same PCR reaction as internal control. PCR products were run on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Quantitative RT-PCR was performed on Stratagene MX3005P apparatus (Agilent Technologies), In all conditions, 1 µg of total RNA was subjected to cDNA synthesis using Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix for qPCR (Invitrogen) and subsequently

amplified during 40 PCR cycles (10 min at 95°C, 15 s at 95°C, 1 min at 60°C) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The specific primers used for mRNA amplification were as follows: *sc35* forward: 5'-CCA-CTC-AGA-GCT-ATG-AGC-TAC-G-3'; *sc35* reverse: 5'-ACT-CCT-TGG-TGT-AGC-GAT-CC-3'; *gapdh* forward: 5'-CGA-GAT-CCC-TCC-AAA-ATC-AA-3'; *gapdh* reverse: 5'-ATC-CAC-AGT-CTT-CTG-GGT-GG-3'.

### **GST pull-down assay**

Beads coated with GST, GST-E2F1 or different GST-truncated E2F1 fusion proteins were prepared according to the manufacturer's protocol (Bulk GST Purification module, Pharmacia Biotech). Beads were incubated for 45 min at room temperature with equivalent amounts of *in vitro* translated SC35 protein in a final volume of 150 µl binding buffer (25 mM HEPES pH 7.6, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM KCl, 0.1% NP40, 20% glycerol) containing 0.2 mg/ml BSA. Beads were washed three times with NETN buffer (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40, 20 mM Tris pH 8.0), once with PBS and then analyzed by 10% SDS-PAGE.

### **Luciferase assays**

Cells were lysed 48 hours after transfection in 300 µl lysis buffer (Passive lysis buffer from Promega). The cell debris were removed by centrifugation at 13200 rpm for 2 min and luciferase activity was measured on a 10 µl aliquot in a luminometer using the luciferase kit from Promega. Each sample was normalized according to the protein amount. Results are the mean of three independent experiments performed in duplicate.

### **Analysis of E2F1 DNA-binding activity using ELISA assay**

The DNA-binding activity of E2F1 was assessed using Transcription Factor (TF) ELISA Kit (Panomics) according the manufacturer's instructions. Briefly, nuclear extracts obtained from Nuclear Extraction Kit (Panomics) were incubated with biotinylated oligonucleotides immobilized on a streptavidin coated 96-well plate and containing an E2F1-consensus binding site (E2F1-Probe). E2F1 protein, bound to the oligonucleotides, was detected by an antibody directed against E2F1. An additional HRP-conjugated secondary antibody provides a sensitive colorimetric readout quantified by spectrometry.

### **Immunohistochemistry and immunohistochemical staining evaluation**

SC35, P-SC35, E2F1 and cyclin E immunohistochemical stainings were performed as previously described on a series of 27 neuroendocrine lung tumors comprising 12 Large Cell

Neuroendocrine Carcinoma (LCNEC) and 15 Small Cell lung Carcinoma (SCLC) (Eymin et al, 2001; Salon et al, 2007). SC35, P-SC35, E2F1 and cyclin E immunostainings were evaluated by two independent observers in distinct areas of the slide sections for correlation and confirmation of tissues analysis and scored by taking into account the tumor heterogeneity. A final score (0–300) was established by multiplying the percentage of labeled cells (0–100%) with the intensity of staining (1–3). According to these final scores, tumoral samples were divided in two classes for each staining, with either tumors overexpressing (+) or not (-) the protein of interest as compared to the normal lung tissues. The scores in normal lung tissues for SC35 and P-SC35 proteins were 100 and 50, respectively. Therefore, tumors displaying a score  $\geq 200$  or  $> 100$  were considered as tumors overexpressing SC35 or P-SC35, respectively. As we previously reported that E2F1 and cyclin E proteins are undetectable in normal lung tissues (Eymin et al, 2001; Salon et al, 2007), tumors with a score  $\geq 40$  were considered as tumors overexpressing these proteins. Correlations between the expression of P-SC35 and cyclin E, as well as P-SC35 and E2F1 were based on the  $\chi^2$  test, with a P-value  $\leq 0.05$  being considered significant.

## Results

### SC35 is a cell-cycle regulated protein

In order to test whether SC35 could control some aspects of the cell cycle in tumor cell lines, we first analysed whether its expression fluctuated during the cell cycle progression. To this purpose, H1299 cells, that are derived from a human lung adenocarcinoma, were synchronised in late G1/early S phase by the use of hydroxyurea. Then, the block was released and the cell cycle distribution was analysed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) after staining of DNA using propidium iodide. As shown in Figures 1A and 1C, H1299 cells timely progressed into the different phases of the cell cycle after hydroxyurea removal, entering and progressing into S phase from 1 to 3 hours, then reaching G2 phase and entering into mitosis from 3 to 6 hours, before returning into G1 phase after 24 hours. To analyse the expression level of SC35 in these cells, we performed western blot and RT-PCR experiments. We observed that both SC35 protein and mRNA levels transiently increased as cells entered and progressed into S phase, then decreased when cells reached the G2/M transition and entered into mitosis (Figures 1B & 1C). Interestingly, such cyclic variation of SC35 protein expression recapitulated those observed, at the protein level, for E2F1, cyclin E or

dihydrofolate reductase (DHFR) (Figure 1C). In order to confirm these results, we used another cellular model, namely the osteosarcoma U2OS cells. These cells were synchronised in late G1 by the use of a double block of thymidine (Figure S1). Again, as detected by western blotting and RT-QPCR, SC35 protein and mRNA levels increased as cells entered and progressed into S phase. Such fluctuation of SC35 protein expression was correlated with the accumulation of both E2F1 and cyclin E proteins in these cells (Figure S1). Taken together, these results are to our knowledge the first evidence that SC35 protein expression is regulated during the cell cycle progression in various tumor cells.

### **SC35 is required for efficient entry and progression into S phase**

Having provided evidence that SC35 is a cell-cycle regulated protein, we next investigated whether its neutralisation by using siRNA or its overexpression after plasmid transfection could have an impact on the cell cycle distribution. To analyse the effects of SC35 downregulation, we took advantage of two human lung neuroendocrine carcinoma cell lines that are highly proliferative and express high levels of SC35 protein, namely the H69 and H810 cells (Merdzhanova et al, 2008). As shown in Figure 2A (upper panel), SC35 expression was efficiently neutralised in these cells upon transfection using a specific siRNA targeting *sc35*. In both models, in comparison with control cells transfected with *mismatch* siRNA, the knock-down of SC35 significantly decreased and increased the proportion of cells in S and G1 phases of the cell cycle, respectively (Figure 2A, lower panel). In addition, the number of cells incorporating bromodeoxyuridine (BrdU) significantly decreased after transfection with *sc35* siRNA, as compared to *mismatch* siRNA (Figure 2B). These data supported the notion that less cells entered in S phase upon SC35 neutralisation. In order to deepen these results, the consequences of SC35 overexpression were analysed in H1299 cells that do not express high basal levels of SC35 protein. As shown in Figure 2C, SC35 overexpression led to an accumulation of cells in S phase. Overall, these results demonstrate that SC35 is involved in the control of S phase entry and progression.

### **SC35 increases the expression of E2F1-target genes involved in S phase transit**

The above data and our previous study identifying a direct link between E2F1 and SC35 proteins (Merdzhanova et al, 2008) prompted us to investigate whether SC35 could regulate the expression level of some proliferative E2F1-target genes. As detected by western blotting, and in comparison with *mismatch* transfected cells, the efficient knock-down of SC35 in H69 cells strongly decreased the expression level of various E2F1-targets either involved in the

regulation of the G1/S transition, such as cyclin E, or required for DNA synthesis, such as the dihydrofolate reductase (DHFR), the thymidilate synthase or the DNA polymerase  $\alpha$  (Figure 3A). Since we previously demonstrated that the p45<sup>SKP2</sup> protein cooperates with E2F1 to control cyclin E expression in neuroendocrine lung carcinoma cell lines (Salon et al, 2007), we studied its expression in H69 cells knocking-down for SC35. Interestingly, p45<sup>SKP2</sup> protein level also decreased in cells deprived of SC35 (Figure 3A). In these conditions, E2F1 protein level did not vary, thereby indicating that the downregulation of all these E2F1-target genes in response to SC35 deprivation was not the global result of decreased E2F1 level. The involvement of SC35 in the control of some of these genes was confirmed in H1299 cells. Indeed, when these cells were transiently transfected with a plasmid encoding SC35, SC35 overexpression led to the accumulation of the cyclin E or DHFR protein (Figure 3B). Overall, these results demonstrate that SC35 is required for the expression of some E2F1-target genes involved in S phase entry and progression in various lung carcinoma cell lines.

### **SC35 and E2F1 proteins interact *in vitro* and *in vivo***

Having provided evidence that SC35 controls the expression level of some E2F1-target genes, we then postulated that both proteins could interact. To test this hypothesis, H1299 cells were co-transfected with an expression vector encoding E2F1 or SC35, and immunoprecipitation experiments of SC35 using a specific anti-SC35 antibody followed by immunodetection of E2F1 were carried-out in whole-cellular extracts. As shown in Figure 4A, an interaction between both E2F1 and SC35 proteins was clearly detected in these conditions. In order to demonstrate that these E2F1/SC35 complexes were not artefacts generated by the overexpression of both proteins, the same immunoprecipitation experiments were repeated in H69 cells. When SC35 immunoprecipitates from these cells were immunoblotted with an antibody against E2F1, co-precipitation of both proteins was detected again indicating that the interaction also occurred between the two endogenous proteins (Figure 4B). In order to deepen these results, SC35-E2F1 binding was further investigated in a cell-free system. To this purpose, an *in vitro*-translated SC35 protein was incubated with a glutathione S-transferase GST-E2F1 fusion protein. The binding between both proteins was detected after recovery of GST-E2F1 complexes and immunoblotting using an anti-SC35 antibody. In this binding assay, *in vitro* translated E2F1 and SC35 proteins co-precipitated efficiently, confirming that both proteins had the ability to physically interact (Figure 4C, lane 2). In order to map the binding sites on E2F1, several GST-E2F1 truncated mutants were generated, and the same experiments were reiterated. Importantly, we found that *in vitro* translated SC35

was unable to bind a GST-E2F1(1-120) mutant deprived of the DNA binding domain (amino acids 120-191) while it bound a GST-E2F1(1-191) mutant, thereby indicating that SC35 interacts within this critical functional domain (Figure 4C, lanes 3 and 4). Of note, SC35 was still able, albeit less efficiently, to bind an E2F1-truncated mutant exhibiting only the carboxy-terminal domain (amino acids 284-437; Figure 4C, lane 6). Therefore, these data suggested the existence of an additional SC35 binding site at the C-terminus of E2F1. Taken together, these results provide the first evidence of a direct interaction between both E2F1 and SC35 proteins.

### **SC35 stimulates the transcriptional activity of E2F1**

Since both E2F1 and SC35 proteins were found to interact, we next questioned whether SC35 could modify the transcriptional activity of E2F1. To answer, we took advantage of two distinct reporter plasmids carrying the expression of the luciferase under the control of either the cyclin E (cyclin E-luc) or p45<sup>SKP2</sup> (Skp2-luc) promoter (Salon et al, 2007). H1299 or SAOS2 cells were transiently co-transfected with one of these vectors in the presence or absence of increasing amounts of plasmid encoding E2F1 and/or SC35. The luciferase activity was measured 48 hours later. As shown in Figure 5A, SC35 strongly stimulated the transcriptional activity of E2F1 towards the cyclin E promoter in a dose-dependent manner. By contrast, SC35 did not affect the activity of a control pGLuc vector. Similar results were obtained when these luciferase assays were repeated using the p45<sup>SKP2</sup> reporter construct (Figure 5B). These data indicated that SC35 was able to stimulate the transcriptional activity of E2F1. To confirm these results, we analysed the effects of the neutralisation of SC35. To this purpose, cells were co-transfected with either cyclin E-luc, Skp2-luc or pGLuc plasmid and siRNAs targeting SC35, in the presence of a plasmid encoding E2F1. In cells transfected with *mismatch* siRNA, E2F1 efficiently stimulated the activity of both the cyclin E and p45<sup>SKP2</sup> promoters (Figure 5C). By contrast, the knock-down of SC35 significantly decreased the activity of E2F1 towards both promoters, while it did not affect the activity of the control pGLuc vector (Figure 5C). In order to test whether this effect of SC35 on E2F1 activity could take place in a more general context, we used the Cignal E2F reporter assay that monitors the transcriptional activity of E2F by using an E2F-responsive luciferase construct encoding the luciferase under the control of tandem repeats of the E2F transcriptional response element (TRE). As shown in Figure S2, SC35 was able to stimulate the transcriptional activity of E2F1 towards this construct. Taken together, these results demonstrate that SC35 is a general activator of E2F1 transcriptional function. Of note, we also tested whether SC35 was able to

enhance the DNA binding of E2F1. As shown in Figure S3, SC35 did not increase the binding of E2F1 to an E2F1 consensus binding site, whereas in the same conditions, DP1 strongly stimulated E2F1 binding to this site.

### **The PI3K/AKT signaling pathway controls SC35 phosphorylation, cyclin E and p45<sup>SKP2</sup> expression**

It has been previously reported that extracellular ligands, such as growth factors, can activate signal-transduction pathways involving Ras, PI3K and AKT that, in turn, phosphorylate SR proteins to modulate alternative splicing in the nucleus and translation in the cytoplasm (Blaustein et al, 2005). Interestingly, a role of the PI3K/AKT signaling in the control of an E2F1-dependent gene expression program was recently discovered and was associated with poor prognosis in breast and ovarian tumors (Hallstrom et al, 2008). Therefore, we investigated whether this pathway could contribute to the proliferative functions of SC35 and E2F1 in our cells. To this purpose, H1299 cells were first co-transfected with cyclin E-luc and E2F1 expression vectors, in the presence or absence of increasing amounts of a plasmid encoding SC35. Transfected cells were then treated or not by wortmaninn, a well-characterized PI3K inhibitor, before measurement of luciferase activities. As shown in Figure 6A, E2F1 and SC35 proteins did not stimulate anymore the activity of the cyclin E promoter in treated cells, as compared to untreated cells. Same results were obtained using the p45<sup>SKP2</sup> reporter plasmid (data not shown). These results indicated that the PI3K/AKT signaling pathway is involved in the stimulation of E2F1 transcriptional function by SC35. In order to deepen these data, we then asked whether SC35 could be a target of PI3K/AKT signaling. To answer, we performed western blot experiments in H69 cells treated with wortmaninn or LY294002, another PI3K inhibitor. Consistent with inhibition of the PI3K signaling, the accumulation of P-AKT(S473) was prevented in treated cells (Figure 6B). Interestingly, as detected by using a specific antibody raised against the phosphorylated form of SC35, both PI3K inhibitors strongly decreased the amount of P-SC35 in whole-cell extracts (Figure 6B), as well as, in chromatin-enriched fractions (Figure 6C). Same data were obtained in H810 cells (data not shown). Of note, the total amount of SC35 protein increased following wortmaninn or LY294002 treatment, thereby suggesting that a PI3K/AKT-dependent negative feedback loop controls SC35 protein level. Overall, these data demonstrate that the PI3K/AKT signaling pathway is required for the efficient phosphorylation of SC35 in neuroendocrine lung carcinoma cell lines. Importantly, cyclin E and p45<sup>SKP2</sup> protein levels strongly decreased in LY294002-treated cells (Figure 6D). In addition, the number of cells

incorporating BrdU also significantly decreased upon inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway (Figure 6E). Therefore, these results support the notion that the phosphorylation of SC35 by PI3K/AKT signaling could be involved in an E2F1-dependent control of S phase entry through the regulation of cyclin E and p45<sup>SKP2</sup> expression notably.

### **Relationships between P-SC35 and cyclin E status in human neuroendocrine lung tumors**

Finally, the above results led us to examine whether SC35, P-SC35, E2F1 and cyclin E expression was linked in a small series of human neuroendocrine lung tumors (n=27), by performing immunohistochemical, RT-PCR or western blot experiments. SCLC and LCNEC are both high grade neuroendocrine lung tumors according to the WHO 1999 classification. As compared to normal lung tissues, SC35 and P-SC35 proteins were highly expressed in 89% (24/27) and 78% (21/27) of neuroendocrine lung tumors, respectively (Figure 7A). Consistent with our previous findings (Eymin et al, 2001; Salon et al, 2007), high levels of E2F1 and cyclin E proteins were observed in 70% (19/27) and 40% (11/27) of these tumors, respectively. The immunohistochemical data concerning SC35 and P-SC35 protein expression were confirmed either by RT-PCR (Figure 7B, upper panel) or western blotting (Figure 7B, lower panel). Interestingly, when we studied the relationships linking SC35, P-SC35, E2F1 and cyclin E proteins in this series, we found a direct correlation linking cyclin E and P-SC35 expression (Figure 7C,  $p=0.0083$ ). By contrast, no significant correlation was found between P-SC35 and E2F1 status. Overall, these data demonstrate for the first time that SC35 and P-SC35 proteins are overexpressed in a series of human neuroendocrine lung tumors and suggest that SC35 could contribute to the control of cyclin E expression in these tumoral subtypes.

### **Discussion**

To date, the contribution of SR proteins to the control of proliferative events and the characterization of some of their specific targets in this setting remain largely unknown. In this study, we provide to our knowledge the first evidence that a SR protein, namely SC35, is cell-cycle regulated in human carcinoma cell lines. Indeed, we show that SC35 amount fluctuates during the cell cycle rising sharply at the G1/S border and remaining elevated as cells progress into S phase. Recently, we identified SC35 as a direct transcriptional target of



E2F1 during apoptosis induced by genotoxic stresses (Merdzhanova et al, 2008). Therefore, since *sc35* mRNA and protein levels were found to mimick the variations of E2F1 all along the cell cycle, these and our previous findings highly suggest that SC35 could also be transcriptionally targeted by E2F1 during the cell cycle progression. We also demonstrate that SC35 interacts and cooperates with E2F1 to regulate the expression of some of its target genes involved in the control of the G1 to S phase transition, such as cyclin E, as well as in S phase progression, such as dihydrofolate reductase. In addition, we show that the knock-down of SC35 reduces the number of cells incorporating BrdU, a phenomenon which is consistent with SC35 being required for S phase entry. It was previously demonstrated that the loss of SC35 in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) induces G2/M cell cycle arrest, resulting at least in part from p53 hyperphosphorylation and hyperacetylation, as well as from p21<sup>WAF1</sup> accumulation (Xiao et al, 2007). In SV40-immortalized MEF, reduction of SR protein production decreases S phase entry (Lin et al, 2005). In *Drosophila*, the SR protein B52 is a positive regulator of the repressive dE2F2 protein leading to repression of genes involved in the G1 to S phase transition (Rasheva et al, 2006). Therefore, the involvement of SR proteins in the control of a specific phase of the cell cycle could be dependent on the cell type (primary versus immortalized for example) or the upstream stimuli. It is also known that excess E2F1 can activate an S phase checkpoint. In addition, stabilisation of cyclin E results in a slowing of S phase progression and arrest (Lu et al, 2009). Because we also observed that SC35 overexpression leads to the accumulation of cyclin E and an increase number of cells in S phase, these data suggest that excessive amount of SC35 could also be involved in a DNA replication checkpoint. Overall, these findings highlight SC35 as an important contributor of S phase transit, which protein level should be timely controlled.

Besides their well-defined functions in splicing, splicing-independent functions of SR proteins are now emerging. Notably, *in vivo* depletion of the SR proteins SC35 and SF2/ASF dramatically attenuated the production of nascent RNA (Lin et al, 2008). Further studies based on the nuclear run-on assay provided evidence for an active role of the SR protein SC35 in transcriptional elongation (Lin et al, 2008). SR proteins have been reported to directly or indirectly associate with the phosphorylated C-terminal domain (CTD) of the largest subunit of Pol II (Misteli & Spector, 1999). Despite strong influence of promoter choice on alternative splicing (Cramer et al, 1999; Auboeuf et al, 2002; Auboeuf et al, 2004), it has been proposed that SR proteins are not preassembled into the transcription initiation complex because they prefer phosphorylated CTD, but CTD phosphorylation is known to take place during the

elongation phase of transcription (Bentley, 2005; Saunders et al, 2006). For example, SR proteins are not stably associated with PolIII at the promoter of *fos* gene before transcriptional induction, and the interaction of SR proteins with the gene after the induction of it appears to be mediated by nascent RNA (Sapra et al, 2009). Importantly, SC35 appears distinct from other SR proteins in this setting, since it is able to exhibit FRET with DNA (Fededa & Kornblihtt, 2008; Sapra et al, 2009). These data imply that SC35 may be more extensively involved in transcription than other SR proteins in the nucleus. Consistently, we provide evidence that SC35 is able to stimulate the transcriptional activity of E2F1 towards several promoters. These data suggest thereby that SC35 could also act at the level of the transcriptional initiation. Interestingly, during the G1 to S phase transition, it has been shown that the human G1 phase regulator HCF-1 mediates E2F1 transcriptional activation on the promoters of S phase genes, through the recruitment of H3K4 histone methyltransferase complexes together with histone acetyltransferase (HAT) (Tyagi et al, 2007). Therefore, based on our findings indicating that SC35 is able to interact with the HAT TIP60 (Edmond et al, submitted), it is tempting to speculate that SC35 could participate to such complexes in order to stimulate E2F1 transcriptional function.

The PI3K/AKT signaling pathway has been recently shown to control the life and death decisions mediated by E2F1 in breast and ovarian carcinoma, by specifically blocking expression of genes involved in the E2F1 apoptotic program, but not the proliferative program (Hallstrom et al., 2008). Here, we show that this pathway also controls the proliferation of neuroendocrine lung carcinoma cell lines, through the positive regulation of the expression of proliferative E2F1-target genes. In this setting, we identify SC35 as a target of this pathway and provide further evidence that activated PI3K/AKT is required for the activity of both E2F1 and SC35 proteins towards the cyclin E promoter. Interestingly, we previously demonstrated that the two SR proteins phosphorylating kinases, namely SRPK1 and SRPK2, controlled SC35 phosphorylation in cellular models derived from Non Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) and were required for SC35-mediated apoptosis (Edmond et al, submitted). By contrast, these two kinases did not regulate the phosphorylation of SC35 in neuroendocrine lung carcinoma cell lines (Edmond, unpublished data). Therefore, these results clearly indicate that distinct signaling pathways dictate SC35 phosphorylation and cell fate, according to different histological subtypes and/or upstream stimuli. Importantly, we provide evidence that SC35 accumulates in an phosphorylated form in neuroendocrine lung tumors and we further demonstrate the existence of a direct correlation linking P-SC35 and

cyclin E expression in these tumors. We and others previously showed that cyclin E is aberrantly expressed in human lung cancer, including neuroendocrine lung tumors (Lonardo et al, 1999; Salon et al, 2007) and predict an unfavorable clinical prognosis (Fukuse et al, 2000). In addition, deregulated cyclin E causes chromosome instability (Spruck et al, 1999). Therefore, these and our findings lead us to propose an hypothetic model in which an AKT-phosphorylated SC35 product could stimulate the transcriptional activity of E2F1 towards the cyclin E promoter, thereby contributing to the genetic instability of the highly aggressive lung neuroendocrine tumors subsets. Further studies are now needed to confirm these data on a larger series of these tumors, as well as, to assess the status of the PI3K/AKT signaling pathway in this setting.

### Acknowledgements

We thank Pascal Perron, Celine Barrial-Lampreia and Floriane Albert for technical assistance. This work was supported by the Comité Départemental Isère de la Ligue contre le Cancer and by the Conseil Scientifique National d'AGIR à dom. Valerie Edmond was supported by a grant from the Conseil Scientifique National d'AGIR à dom. Galina Merdzhanova was supported by fellowships from the Research French Ministry and the Fondation pour la Recherche Medicale (FRM).

### References

- Auboeuf D, Dowhan DH, Kang YK, Larkin K, Lee JW, Berget SM, O'Malley BW (2004) Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2270-2274.
- Auboeuf D, Honig A, Berget SM, O'Malley BW (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science*, **298**, 416-419.
- Bentley DL (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 251-256.
- Blais A, Dynlacht BD (2004) Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 527-532.

- Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Munoz MJ, Wengier D, Quadrana L, Sanford JR, Muschiatti JP, Kornblihtt AR, Caceres JF, Coso OA, Srebrow A (2005) Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 1037-1044.
- Cramer P, Caceres JF, Cazalla D, Kadener S, Muro AF, Baralle FE, Kornblihtt AR (1999) Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell*, **4**, 251-258.
- DeGregori J, Johnson DG (2006) Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med*, **6**, 739-748.
- Dimova DK, Dyson NJ (2005) The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*, **24**, 2810-2826.
- Ding JH, Xu X, Yang D, Chu PH, Dalton ND, Ye Z, Yeakley JM, Cheng H, Xiao RP, Ross J, Chen J, Fu XD (2004) Dilated cardiomyopathy caused by tissue-specific ablation of SC35 in the heart. *EMBO J*, **23**, 885-896.
- Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E (2001) Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene*, **20**, 1678-1687.
- Fededa JP, Kornblihtt AR (2008) A splicing regulator promotes transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 779-781.
- Fukuse T, Hirata T, Naiki H, Hitomi S, Wada H (2000) Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **60**, 242-244.
- Hallstrom TC, Mori S, Nevins JR (2008) An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death. *Cancer Cell*, **13**, 11-22.
- Harbour JW, Dean DC (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, **14**, 2393-2409.
- Johnson DG, Degregori J (2006) Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context. *Curr Mol Med*, **6**, 731-738.
- Jumaa H, Wei G, Nielsen PJ (1999) Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20. *Curr Biol*, **9**, 899-902.
- Lin S, Coutinho-Mansfield G, Wang D, Pandit S, Fu XD (2008) The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 819-826.
- Lin S, Xiao R, Sun P, Xu X, Fu XD (2005) Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation. *Mol Cell*, **20**, 413-425.

- Lonardo F, Rusch V, Langenfeld J, Dmitrovsky E, Klimstra DS (1999) Overexpression of cyclins D1 and E is frequent in bronchial preneoplasia and precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res*, **59**, 2470-2476.
- Lu X, Liu J, Legerski RJ (2009) Cyclin E is stabilized in response to replication fork barriers leading to prolonged S phase arrest. *J Biol Chem*, **284**, 35325-35337.
- Merdzhanova G, Edmond V, De Seranno S, Van den Broeck A, Corcos L, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B (2008) E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ*, **15**, 1815-1823.
- Misteli T, Spector DL (1999) RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell*, **3**, 697-705.
- Rasheva VI, Knight D, Bozko P, Marsh K, Frolov MV (2006) Specific role of the SR protein splicing factor B52 in cell cycle control in *Drosophila*. *Mol Cell Biol*, **26**, 3468-3477.
- Salon C, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S (2006) E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ*, **13**, 260-272.
- Salon C, Merdzhanova G, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B (2007) E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors. *Oncogene*, **26**, 6927-6936.
- Sapra AK, Anko ML, Grishina I, Lorenz M, Pabis M, Poser I, Rollins J, Weiland EM, Neugebauer KM (2009) SR protein family members display diverse activities in the formation of nascent and mature mRNPs in vivo. *Mol Cell*, **34**, 179-190.
- Saunders A, Core LJ, Lis JT (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 557-567.
- Spruck CH, Won KA, Reed SI (1999) Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature*, **401**, 297-300.
- Tyagi S, Chabes AL, Wysocka J, Herr W (2007) E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell*, **27**, 107-119.
- Wang HY, Xu X, Ding JH, Bermingham JR, Jr., Fu XD (2001) SC35 plays a role in T cell development and alternative splicing of CD45. *Mol Cell*, **7**, 331-342.

Xiao R, Sun Y, Ding JH, Lin S, Rose DW, Rosenfeld MG, Fu XD, Li X (2007) Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and cell proliferation during mammalian organogenesis. *Mol Cell Biol*, **27**, 5393-5402.

## Legends to figures

**Figure 1: SC35 is a cell-cycle regulated protein.** H1299 human lung adenocarcinoma cells were treated for 18 h with 1 mM hydroxyurea, then washed and released in hydroxyurea free complete medium. Cells were harvested at the indicated time points after block release. (A) Cell synchronization was assessed by flow cytometry after staining with propidium iodide. Percentages of cells in the different phases of cell cycle are mentioned for each time. (B, left panel) Expression of *sc35* transcripts was studied by RT-PCR at the different times following block release as indicated. Amplified *g3pdh* was used as an internal control. (Right panel) *sc35* densitometric signals were normalized to *g3pdh*. A value of 1 was arbitrarily assigned to the signal obtained at block release. (C) Total cellular extracts were subjected to western blotting for the detection of SC35, E2F1, cyclin E, cyclin A and DHFR proteins. Actin was used as a loading control. Percentages of cells in the different phases of the cell cycle are shown for each time in the lower panel.

**Figure 2: SC35 is required for efficient S phase entry and progression.** (A and B) H810 and H69 cells were transfected for 72 h with either *mismatch* or *SC35* siRNAs. (A, upper panel) Efficient neutralization of SC35 was assessed by western blotting. (Lower panel) Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry after labelling of DNA with propidium iodide. Percentages of cells in the different phases are indicated. (B) BrdU incorporation was studied by FACS. The percentage of cells having incorporated BrdU is indicated in each condition. (C) H1299 cells were transfected for 48 h with either an expression vector encoding SC35 protein or a control plasmid. (Upper panel) SC35 overexpression was assessed by western blotting. (Lower panel) Cell cycle distribution was studied by flow cytometry following propidium iodide staining. Percentages of cells in the different phases are showed.

**Figure 3: SC35 induces the expression of some E2F1-target genes involved in the G1/S transition and S phase progression.** (A) H69 lung carcinoma cells were transfected for 72 h

with either *mismatch* or *SC35* siRNAs. Expression of several proteins required for DNA synthesis and G1/S progression as well as E2F1 was examined by western blotting using the appropriate antibodies. Actin was used as a loading control. (B) H1299 cells were transfected for 48 h with either an expression vector encoding SC35 protein or a control plasmid. Total cellular extracts were subjected to western blot analysis with the indicated antibodies. Actin was used as a loading control.

**Figure 4: SC35 and E2F1 proteins interact *in vitro* and *in vivo*.** (A) H1299 cells were co-transfected for 48 h with SC35 and E2F1 expression vectors. Whole cellular extracts were immunoprecipitated with anti-SC35 antibody or an irrelevant IgG as a negative control, and immunoblotted with anti-E2F1 or anti-SC35 antibody. (B) Endogenous SC35 protein was immunoprecipitated from H69 extract with an anti-SC35 antibody. Western blotting was then carried out using either anti-E2F1 or anti-SC35 antibody. (C, upper panel) A schematic representation of E2F1 fragments used in this study. The ability of each fragment to interact with an *in vitro* translated SC35 protein is reported. (Lower panel) *In vitro* translated recombinant SC35 protein was subjected to a GST pull-down assay using GST-E2F1 or GST-E2F1 fusion proteins as a bait. The interaction between recombinant GST-E2F1 and SC35 proteins was detected by western blotting using an anti-SC35 antibody. An immunoblot with anti-GST antibody is shown to verify the expression level of GST-E2F1 fusion proteins.

**Figure 5: SC35 stimulates the transcriptional activity of E2F1 towards the cyclin E and p45<sup>SKP2</sup> promoters.** (A) Luciferase experiments were conducted in H1299 and SAOS2 cell lines co-transfected for 48 h with 1 µg pGL2-cyclin E-luc encoding the luciferase under the control of the cyclin E promoter or 1 µg pGLuc as a control, in the presence or absence of 50 ng pCMV-E2F1 and increasing amounts of pcDNA3-SC35 (100 and 250 ng). The luciferase activity obtained in cells transfected with pGL2-cyclin E-luc or pGLuc was normalized to 1 and a relative luciferase activity was then calculated for each condition. (B) H1299 cells were co-transfected for 48 h with 1 µg of a Skp2-luc plasmid encoding the luciferase under the control of Skp2 promoter, in the presence or absence of 50 ng pCMV-E2F1 and increasing amounts of pcDNA3-SC35 (50, 100 and 250 ng) as indicated. The luciferase activity obtained in cells transfected with Skp2-luc alone was normalized to 1 and a relative luciferase activity was then calculated for each condition. (C) H1299 cells were transfected with either *mismatch* or *SC35* siRNAs. Twenty four hours later, cells were co-transfected with either pGL2-cyclin E-luc, Skp2-luc or pGL3-luc plasmid, in the presence or absence of 50 ng pCMV-E2F1 as

indicated. The luciferase activity obtained in cells transfected with either pGL2-cyclin E-luc, Skp2-luc or pGLuc alone was normalized to 1 and a relative luciferase activity was then calculated for each condition.

**Figure 6: The PI3K/AKT signaling pathway is involved in the control of cyclin E and p45<sup>SKP2</sup> expression by SC35 and E2F1 proteins.** (A) H1299 cells were co-transfected for 48 h with 1 µg of pGL2-cyclin E-luc in the presence or absence of 50 ng pCMV-E2F1 and increasing amounts of pcDNA3-SC35 (50, 100 and 250 ng), and treated or not with 250 nM wortmannin. The luciferase activity obtained in cells transfected with pGL2-cyclin E-luc alone was normalized to 1 and a relative luciferase activity was then calculated for each condition. (B) Total cellular extracts from H69 cells treated or not for 24 h with 500 nM wortmannin or 50 µM LY294002 were subjected to western blotting for the detection of SC35 and P-SC35 proteins. Anti-P-AKT (S473) antibody was used to verify AKT inactivation. (C) Chromatin-enriched extracts obtained from H69 cells treated or not for 24 h with 50 µM LY294002 were immunoblotted with an anti-P-SC35 antibody. Histone H3 was used as a loading control. (D) Whole cellular extracts from H69 cells treated or not for 24 h with 50 µM LY294002 inhibitor were subjected to western blotting for the detection of cyclin E and p45<sup>SKP2</sup> proteins. Anti-P-AKT (S473) antibody was used to ascertain AKT inactivation. (E) H69 cells were treated or not for 24 h with 50 µM LY294002 and BrdU incorporation was studied by FACS. The percentage of cells having incorporated BrdU is indicated in each condition.

**Figure 7: SC35 and P-SC35 proteins are upregulated in high-grade neuroendocrine lung tumors.** (A) Immunohistochemical analysis of SC35, P-SC35, cyclin E and E2F1 expression in a panel of 27 neuroendocrine lung tumors. For each staining, the number of tumors that do not overexpress (-) or overexpress (+) the protein of interest as compared to normal lung tissues is presented, according to the final scores defined in the materials and methods section (B, upper panel) *sc35* mRNA level was analyzed by RT-PCR in three normal lung tissues, seven small cell lung carcinoma (SCLC) and five large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC). *g3pdh* was used as an internal control. (Lower panel) SC35 and P-SC35 protein expression were studied by western blotting in five SCLC (T) in comparison with their normal lung tissue counterpart (N). Actin was used as a loading control. (C) Relationship between P-SC35, cyclin E and E2F1 status. A direct correlation ( $\chi^2$  test,  $p = 0.0083$ ) between



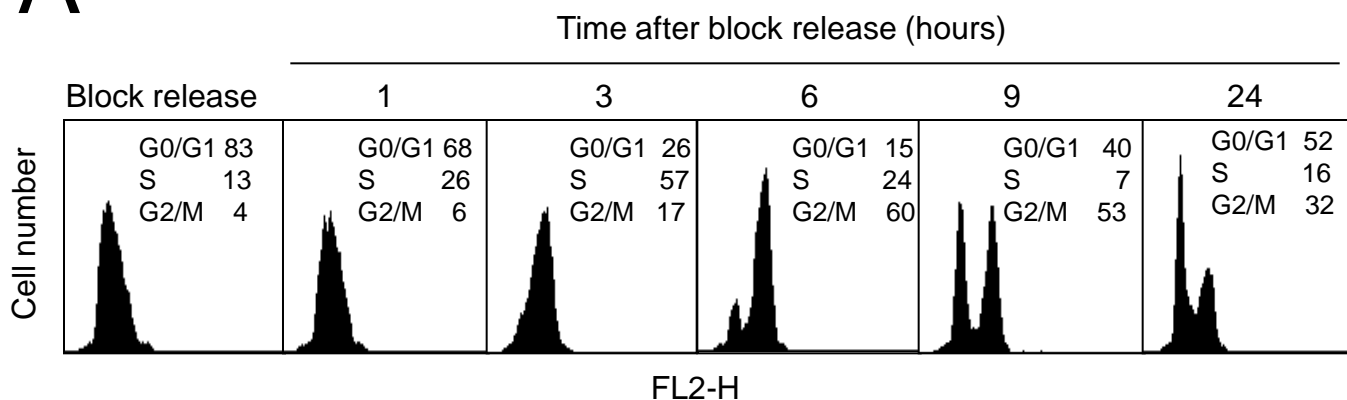
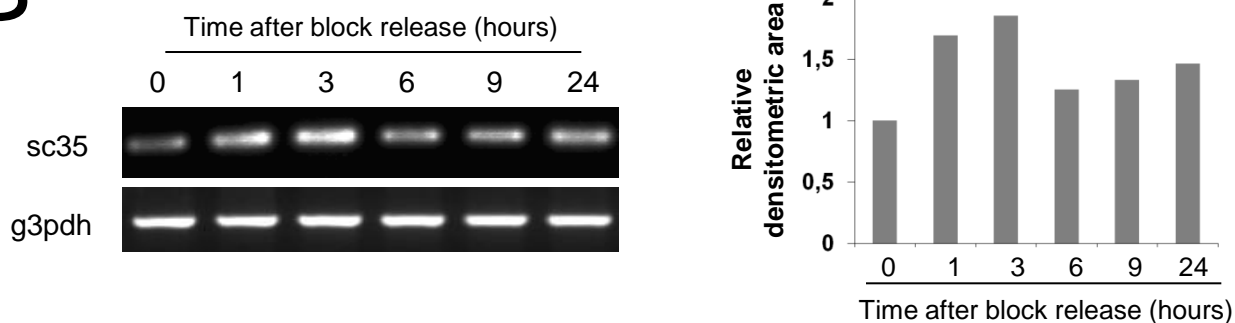
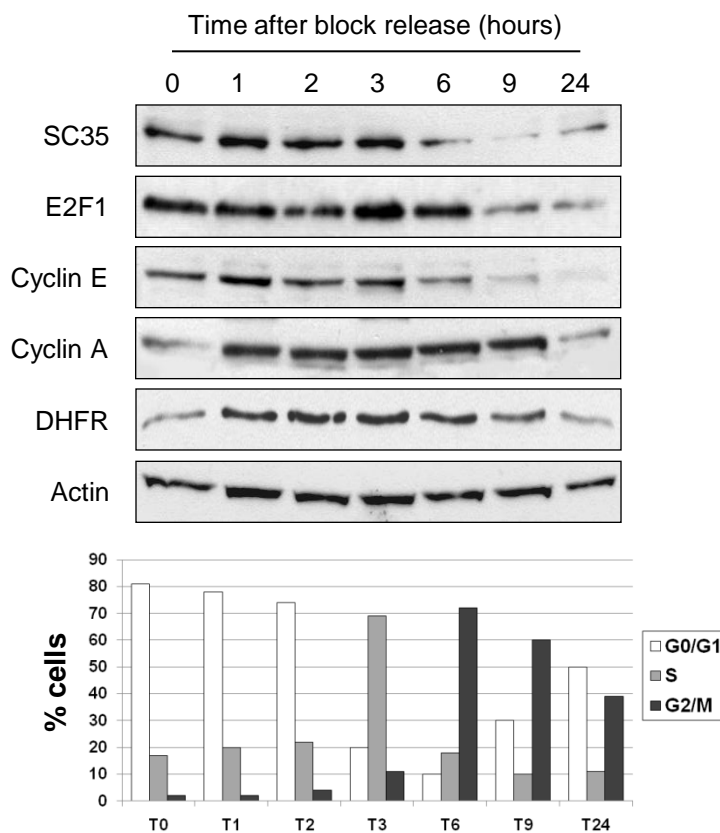
cyclin E expression and SC35 phosphorylation status is shown. Cyclin E -, score < 40. Cyclin E +, score  $\geq$  40. P-SC35 -, score  $\leq$  100. P-SC35 +, score > 100.

## Supplementary Figures

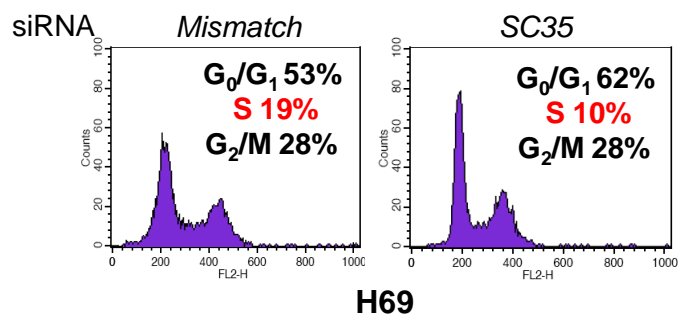
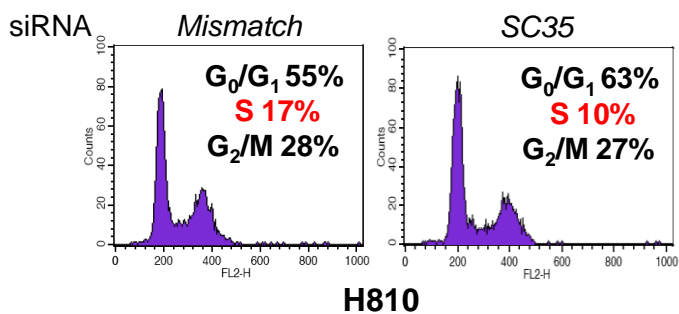
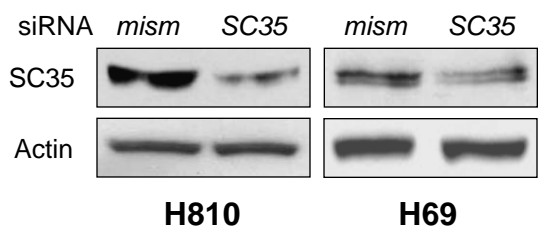
**Figure S1:** U2OS cells were synchronized by a double block of thymidine as described in the Materials and Methods section, then released in thymidine free complete medium and harvested at the indicated time points. (A) Cell synchronization was assessed by flow cytometry after staining with propidium iodide. (B) Expression of SC35, E2F1, cyclin E and DHFR proteins was studied by western blotting using the indicated antibodies. Actin was used as a loading control. (C) *sc35* transcripts were quantified by RT-QPCR at different times following block release as indicated. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) was used as a reference. Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of *sc35* copy number (target gene) to *gapdh* mRNA copy number multiplied by 100, thus normalizing *sc35* mRNA expression. The ratio obtained in non treated cells was arbitrarily assigned a value of 1.

**Figure S2: SC35 positively affects E2F1 transcription activity toward E2F-responsive luciferase construct.** Luciferase assays were performed from H1299 cells co-transfected for 48 h with E2F Cignal™ Reporter (SuperArray) in the presence or absence of 50 ng pCMV-E2F1 and increasing amounts of pcDNA3-SC35 (50, 100 and 200 ng). The luciferase activity obtained in cells transfected with E2F Cignal™ Reporter alone was normalized to 1 and a relative luciferase activity was then calculated for each condition.

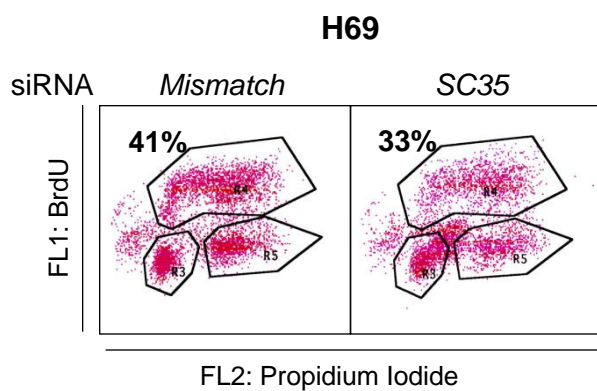
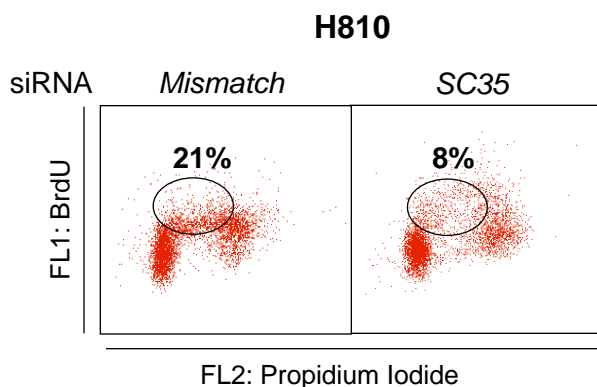
**Figure S3: SC35 does not affect E2F1 DNA-binding.** SAOS2 and H1299 cells were co-transfected for 48 h with 3  $\mu$ g pCMV-E2F1 in the presence or absence of 9  $\mu$ g pCMV-DP1 and increasing amounts of pcDNA3-SC35 (6 and 9  $\mu$ g). Nuclear extracts obtained from Nuclear Extraction Kit (Panomics) were used in an ELISA assay for the analysis of E2F1 DNA-binding activity according to the manufacturer's protocol.

**Fig 1****A****B****C**

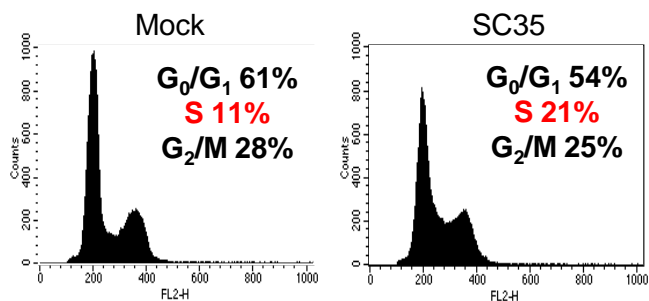
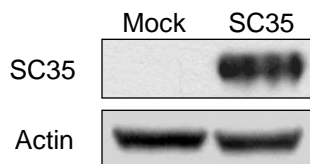
**A**

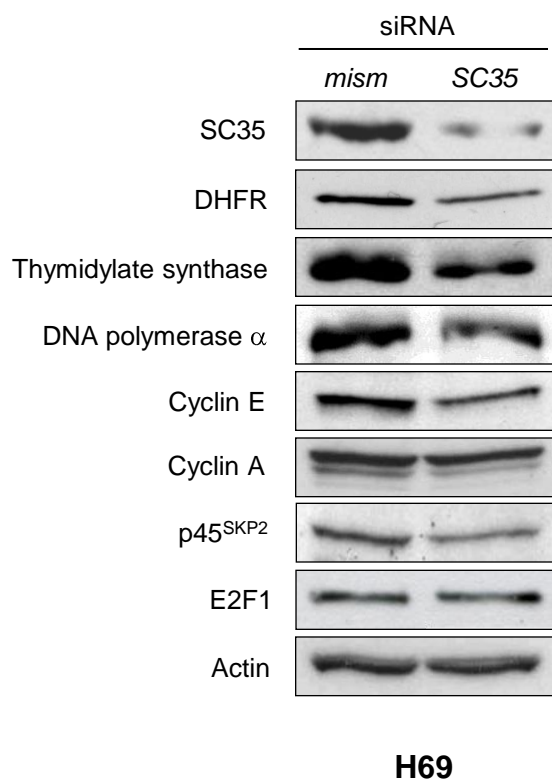
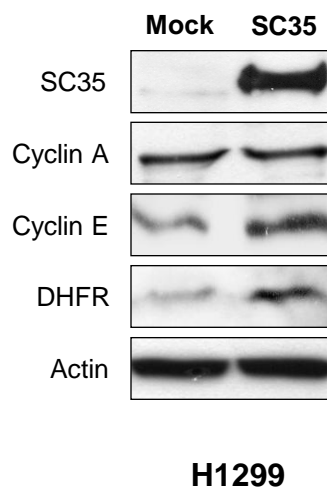


**B**

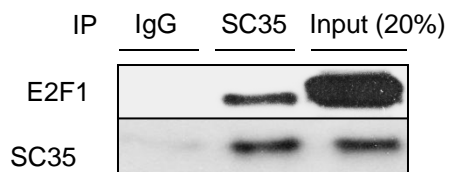


**C**

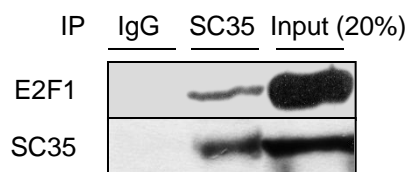


**A****B**

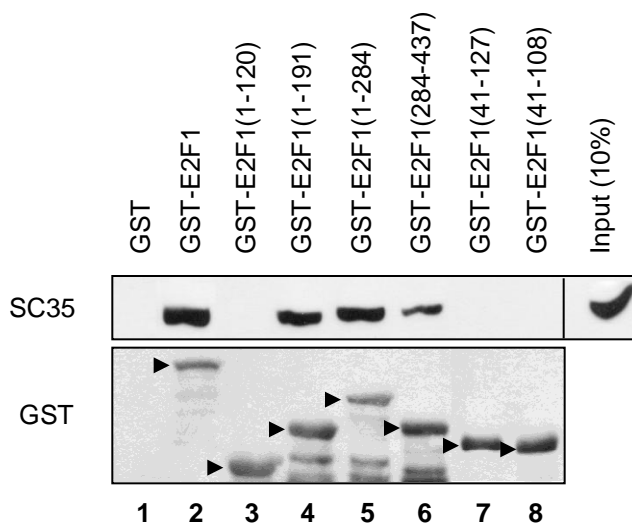
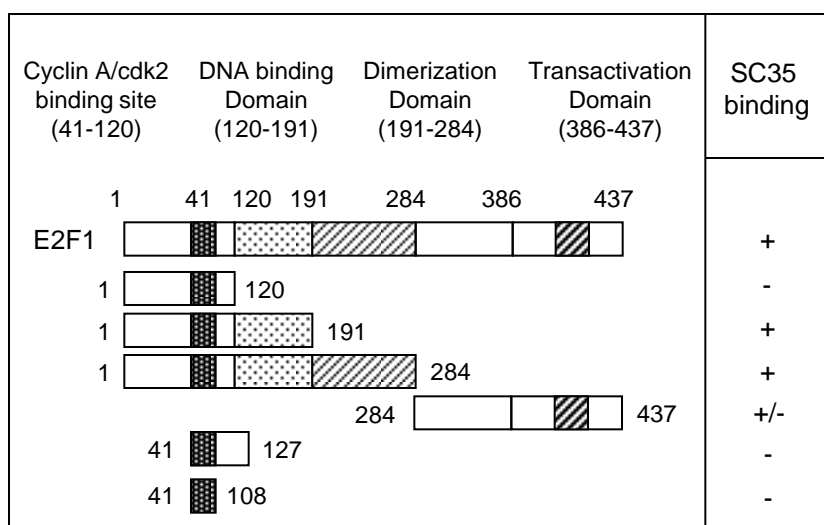
## A



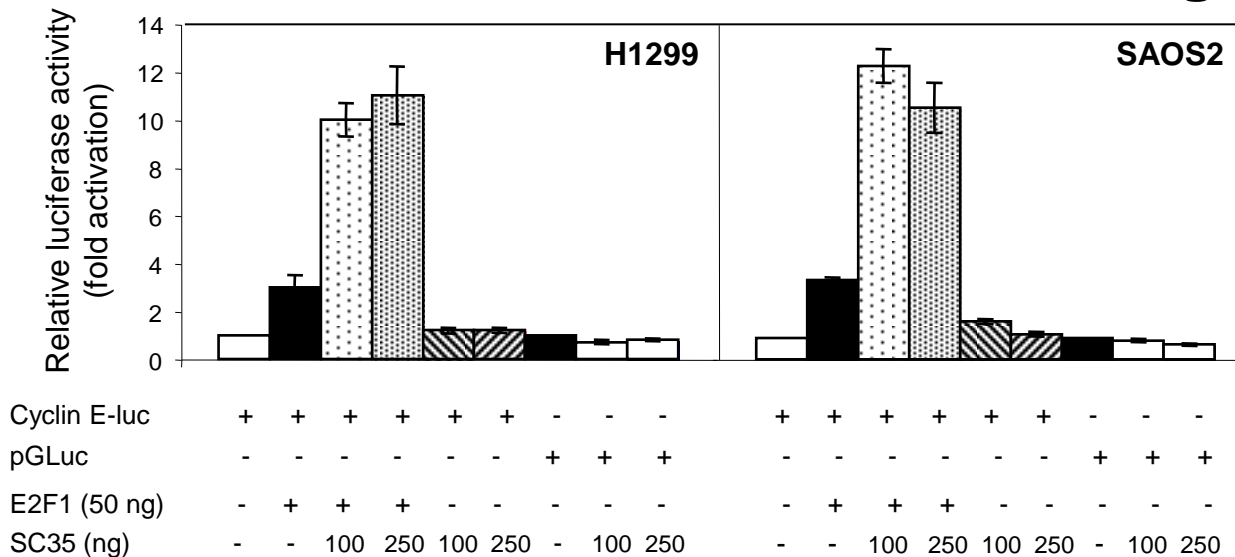
## B



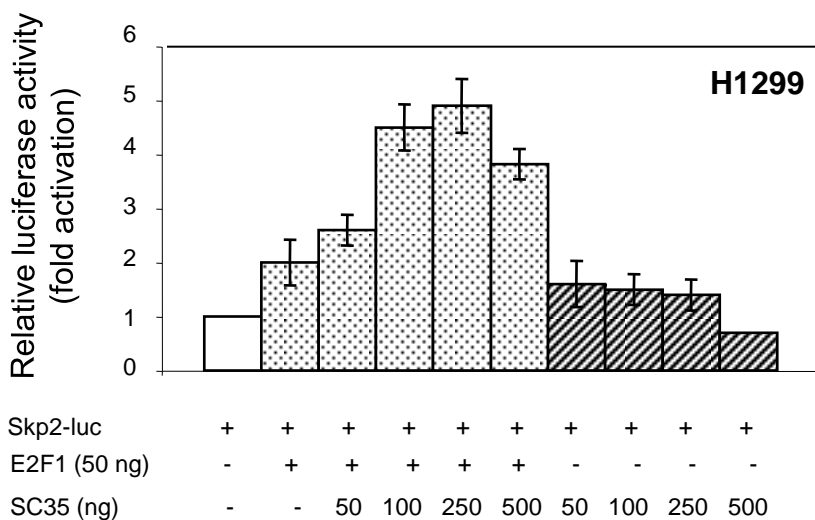
## C



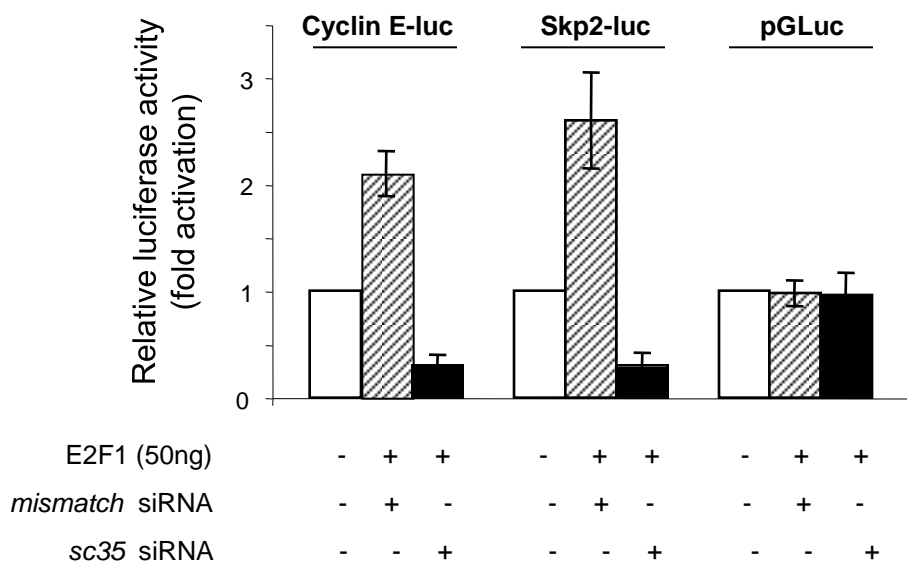
A



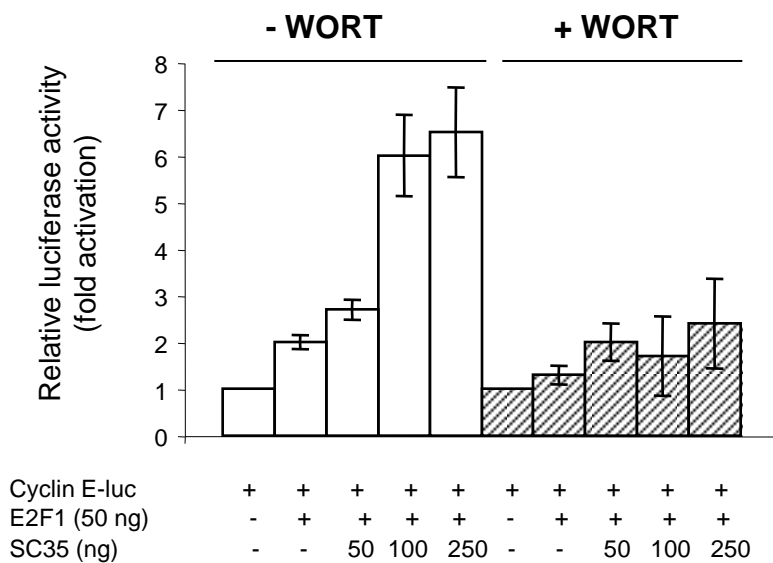
B



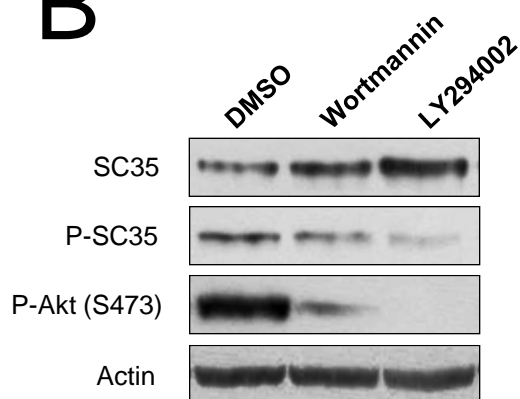
C



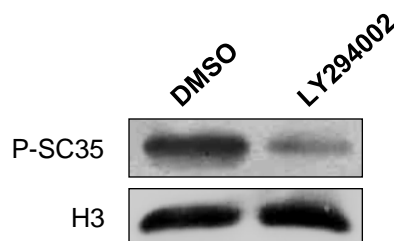
## A



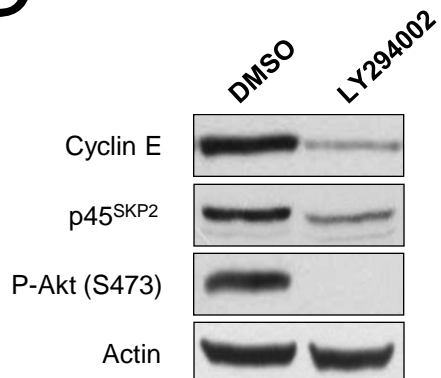
## B



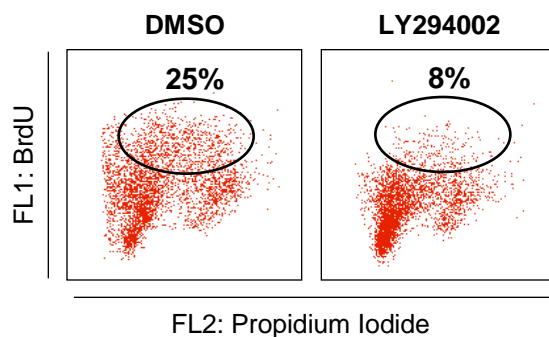
## C



## D



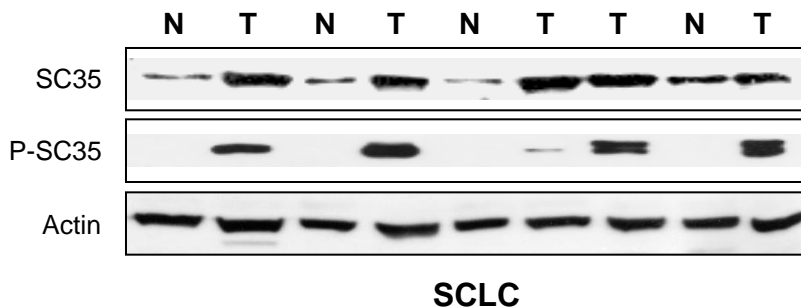
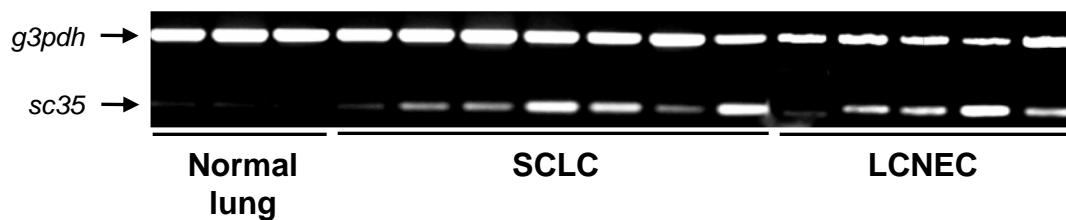
## E



A

Total Neuroendocrine Lung tumors	SC35 expression level		P-SC35 expression level		Cyclin E expression level		E2F1 expression level	
	SC35 -	SC35 +	P-SC35 -	P-SC35 +	Cyclin E -	Cyclin E +	E2F1 -	E2F1 +
27	3 (11%)	24 (89%)	6 (22%)	21 (78%)	16 (60%)	11 (40%)	8 (30%)	19 (70%)

B

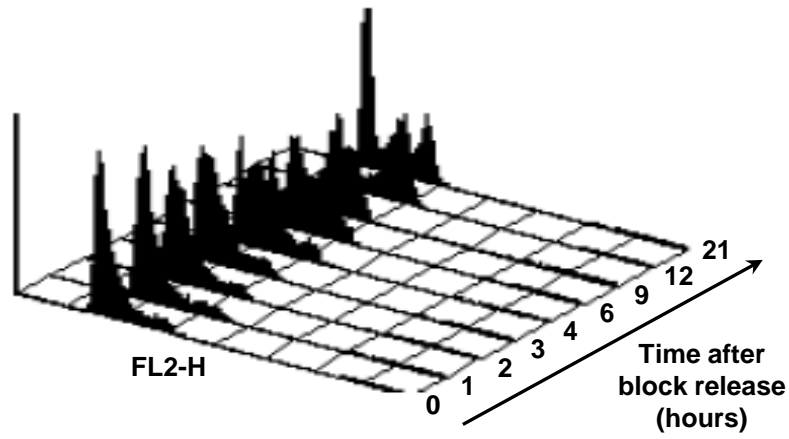


C

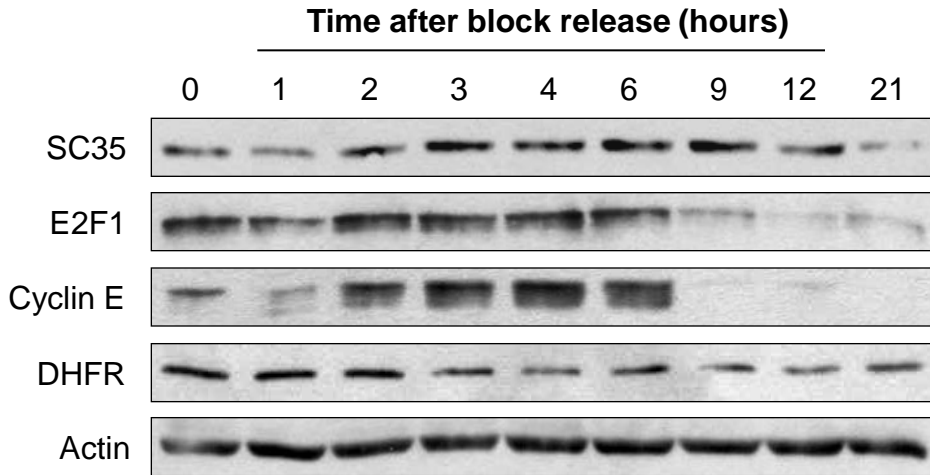
Neuroendocrine Lung Carcinoma n = 27	P-SC35 expression level		
	P-SC35 -	P-SC35 +	p
Cyclin E -	6	10	p = 0.0083
Cyclin E +	0	11	
E2F1 -	6	10	NS
E2F1 +	3	8	



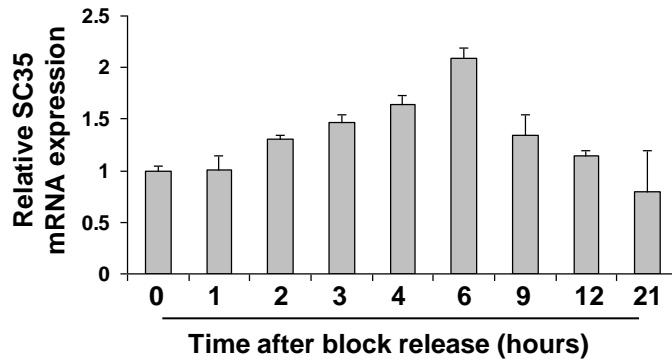
A

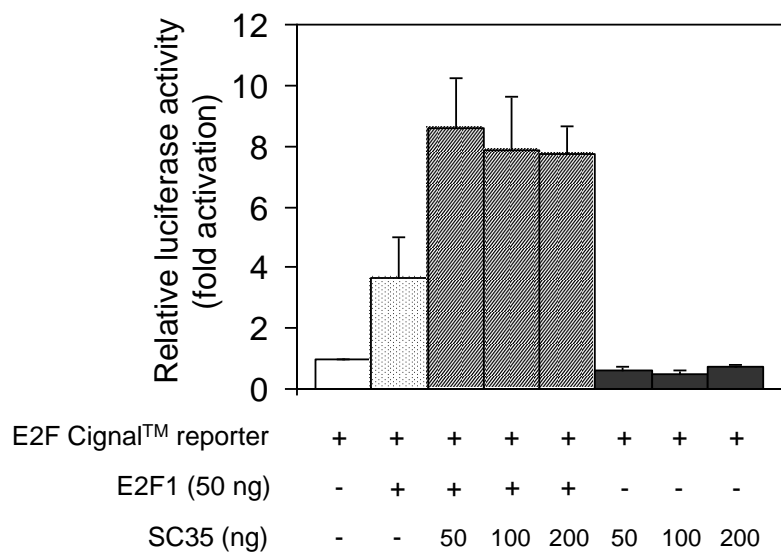


B

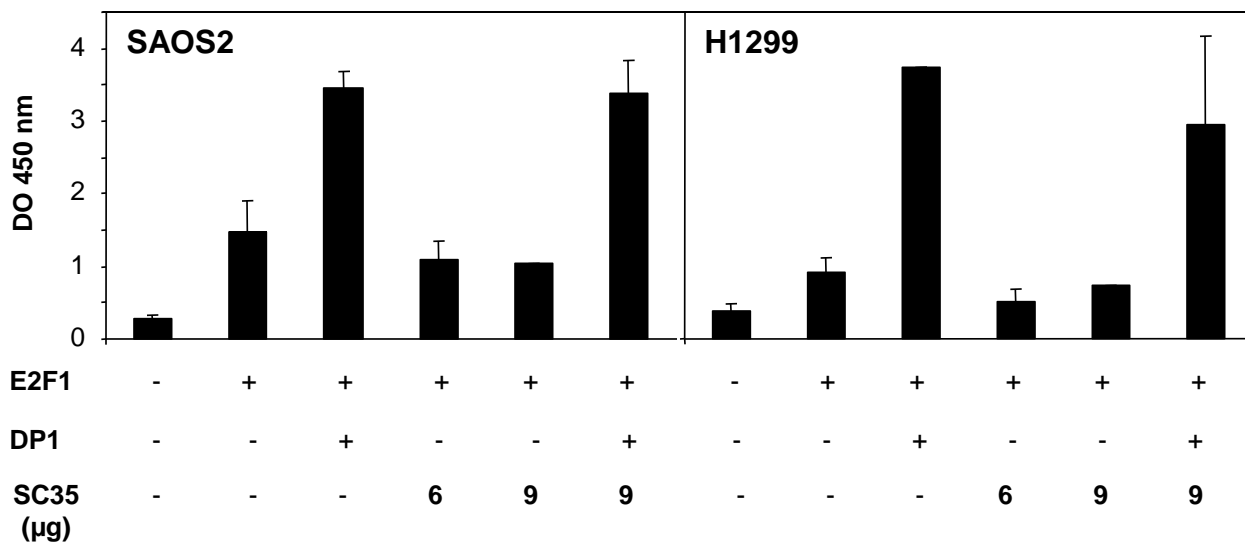


C





# FigS3



## **I. Mise en évidence d'une connexion étroite entre l'acétylation et la phosphorylation de SC35 pour le contrôle de son « turn-over » protéique et de ses activités biologiques**

### **I.1. Identification d'une nouvelle modification post-traductionnelle de SC35 de type acétylation**

Il est maintenant bien établi que les protéines SR sont phosphorylées au sein de leur domaine RS et que cette phosphorylation contrôle largement leur activité, leur spécificité et leur localisation subcellulaire. Des données récentes indiquent que certaines protéines SR sont également soumises à d'autres types de modifications post-traductionnelles. Ainsi, la méthylation de trois résidus arginine de la protéine SR SF2/ASF a été décrite comme contrôlant sa localisation subcellulaire (Ong *et al*, 2004; Sinha *et al*, 2010). De plus, l'analyse globale de l'acétylation de protéines au niveau de résidus lysines par spectrométrie de masse de haute résolution montre que plusieurs protéines SR pourraient être acétylées, comme par exemples SF2/ASF, SC35 ou encore SRp20 (Choudhary *et al*, 2009). Dans ce contexte, l'analyse des domaines structuraux des protéines acétylées révèle que les motifs de reconnaissance de l'ARN ou domaines RRM sont surreprésentés dans l'acétylome des lysines, supportant largement un rôle de cette modification post-traductionnelle dans le contrôle des événements d'épissage. Dans cette étude, nous démontrons « *in vitro* » et « *in vivo* » que le facteur d'épissage SC35 est une protéine acétylée. Nous avons étayé ce résultat en identifiant la lysine 52 (K52) localisée au sein du domaine RRM comme une cible d'acétylation. Ainsi, à côté de la phosphorylation, nous caractérisons l'acétylation comme une nouvelle modification post-traductionnelle d'un membre de la famille des protéines SR. Nos résultats sont en accord avec les données obtenues par Choudhary et collaborateurs, même si les auteurs de cette étude identifient la lysine 36 comme la cible principale d'acétylation dans leur modèle cellulaire (Choudhary *et al*, 2009). De façon intéressante, nous n'avons pas réussi à produire en bactérie la protéine recombinante SC35 (1-60) (K36R), suggérant que le résidu K36 pourrait être un résidu important pour la stabilité de SC35. Nos résultats ne nous permettent donc pas de conclure quant à l'éventuelle acétylation du résidu K36 de SC35 dans nos modèles. De plus, même si nous identifions un rôle de l'acétylation du résidu K52 dans le contrôle du « turn-over » de SC35, la possibilité que cette acétylation au sein du domaine RRM affecte également la liaison de SC35 à l'ARN reste à explorer. Il reste aussi à rechercher si d'autres protéines SR dans nos modèles d'étude pourraient être soumises à

acétylation. De façon générale, et comme discuté dans l'introduction, il a été récemment montré un lien entre la structure de la chromatine et le contrôle de l'épissage des transcrits, via notamment des modifications post-traductionnelles spécifiques de certaines histones (Sims *et al*, 2007; Kolasinska-Zwierz *et al*, 2009; Luco *et al*, 2010). Nos travaux renforcent ce lien en mettant en évidence pour la première fois une relation directe entre un agent de remodelage de la chromatine (Tip60) et un composant du spliceosome (SC35).

## **I.2. Implication de l'acétyltransférase Tip60 dans le contrôle du « turn-over » protéique de SC35**

Nos résultats montrent que Tip60 interagit avec SC35, l'acétyle sur son résidu K52 et conditionne sa dégradation par le protéasome dans nos modèles cellulaires. La régulation de la stabilité protéique par acétylation est un phénomène général affectant différentes classes de protéines. Ainsi, la plupart des exemples décrits dans la littérature désigne l'acétylation des lysines comme une modification post-traductionnelle stabilisatrice, impliquant un effet de compétition vis-à-vis de l'ubiquitination sur un même résidu lysine (pour revue, Sadoul *et al*, 2008). A l'inverse et en accord avec nos résultats, l'acétylation des lysines comme signal favorisant la dégradation protéique a aussi été rapportée (Leduc *et al*, 2006; pour revue, Sadoul *et al*, 2008). Dans ce cas, l'acétylation des lysines gouverne la stabilité protéique essentiellement à travers la modulation des interactions protéine-protéine. Dans cette étude, nous n'avons pas élucidé les mécanismes moléculaires par lesquels Tip60 cible SC35 pour sa dégradation protéasomale, mais il a été précédemment décrit que Tip60 peut interagir avec des E3 ubiquitine ligases comme MDM2 (Legube *et al*, 2002) ou Pirh2 (Logan *et al*, 2004). Il est donc tentant de spéculer que Tip60 puisse agir comme un adaptateur permettant le recrutement de complexe(s) ubiquitine ligase(s) spécifique(s) et la stimulation de leur activité envers SC35. Des expériences de co-immunoprécipitation permettraient donc de rechercher l'existence éventuelle d'interaction entre SC35 et ces E3 ubiquitine ligases. De façon intéressante, il a été précédemment rapporté que SC35 colocalise partiellement avec le protéasome 20S et s'accumule après traitement à la lactacystine, un inhibiteur du protéasome (Dino Rockel & von Mikecz, 2002). Ainsi, de la même manière que SRp55, une autre protéine SR, capable d'être dégradée par le protéasome (Lai *et al*, 2003), nos données suggèrent que la protéolyse dépendante du protéasome pourrait être un mécanisme général pour contrôler le « turn-over » des protéines SR. Il serait intéressant d'étudier la localisation sub-cellulaire de SC35 sous forme acétylée en présence d'inhibiteurs du protéasome afin de

déterminer si cette forme co-localise avec les protéasomes nucléaires et/ou cytoplasmiques. La polyubiquitination des protéines est généralement un pré-requis à leur dégradation protéasomale. Nous n'avons pas été en mesure de détecter SC35 sous forme ubiquitinylée dans nos conditions expérimentales, même après traitement par un inhibiteur du protéasome. Ces résultats suggèrent que : (i) la protéine SC35 polyubiquitinylée pourrait être une forme trop transitoire pour être détectée par les techniques dont nous disposons au laboratoire; (ii) la dégradation de SC35 via la machinerie du protéasome pourrait ne pas faire intervenir d'étape préliminaire de polyubiquitination. Cependant, dans les cellules traitées par le NaBu dans lesquelles SC35 s'accumule sous forme hyperacétylée, nous avons réalisé des expériences préliminaires d'ubiquitination « *in vitro* » et détecté des bandes de plus haut poids moléculaire qui pourraient représenter des formes mono ou polyubiquitinylées de SC35. De plus, comme mentionné dans le paragraphe suivant, SC35 est stabilisée par HDAC6. Ces résultats suggèrent donc que SC35 pourrait être ubiquitinylée et demandent à être approfondis. Alternativement, il se pourrait que la dégradation de SC35 par le protéasome implique d'autres modifications post-traductionnelles de type sumoylation ou neddylation. Ainsi, des expériences supplémentaires sont nécessaires afin d'examiner plus en détail la connexion existant entre la forme acétylée de SC35 et les composants de la machinerie de l'ubiquitination. De même, il reste à savoir si d'autres HATs acétylent SC35 et médient les mêmes effets que Tip60.

### **I.3. La déacétylase HDAC6 : un régulateur clé de la stabilité protéique de SC35**

De nombreuses données de la littérature soulignent l'étroite connexion fonctionnelle existant entre HDAC6 et la voie ubiquitine-protéasome, notamment via l'interaction de HDAC6 avec des chaînes mono- et poly-ubiquitinylées (Seigneurin-Berny *et al*, 2001; Hook *et al*, 2002; Boyault *et al*, 2006). Ainsi, la fixation de haute affinité de HDAC6 à l'ubiquitine empêche la reconnaissance des protéines ubiquitinylées par d'autres facteurs fixant l'ubiquitine et retarde leur dégradation ultérieure par le protéasome ou par les protéases spécifiques de l'ubiquitine (Boyault *et al*, 2006). Dans cette étude, nous avons établi que HDAC6 est un régulateur positif critique de l'expression de SC35. Nous montrons que cet effet nécessite son domaine déacétylase et que, là encore, la lysine 52 est un résidu déterminant puisque HDAC6 n'est plus capable d'affecter le niveau d'expression de la protéine SC35 dans laquelle la lysine 52 a été remplacée par une arginine. Ces résultats

permettent d'envisager que la déacétylation de SC35 par HDAC6 pourrait prévenir sa dégradation. De plus, nous montrons que le domaine de fixation à l'ubiquitine de HDAC6 est également indispensable pour la stabilisation de SC35. D'ailleurs, dans les modèles cellulaires murins surexprimant les différents mutants fonctionnels de HDAC6, il semble que l'activité de liaison à l'ubiquitine de HDAC6 est majoritairement requise pour la stabilisation de SC35. A ce stade, différentes hypothèses peuvent donc être émises. Première hypothèse, HDAC6 pourrait interagir directement avec SC35 ubiquitinylée et acétylée, si SC35 est effectivement soumise dans certaines conditions à ubiquitination, et ainsi prévenir sa dégradation. Nous avons d'ailleurs montré que HDAC6 et SC35 sont capables d'interagir et que leur interaction est stimulée par le NaBu. Deuxième hypothèse, l'effet de HDAC6 sur SC35 pourrait être indirect, via l'interaction de HDAC6 avec une protéine nécessaire à la stabilisation de SC35. Un rôle des protéines chaperonnes dans ce cadre pourrait être envisageable.

Une des principales caractéristiques de HDAC6 est sa localisation dans le cytoplasme via un phénomène de rétention active dans ce compartiment cellulaire. Néanmoins, certains travaux ont rapporté son interaction avec des protéines nucléaires, de même que, son rôle sur l'activité transcriptionnelle de différents facteurs. Ainsi, dans certaines conditions, HDAC6 pourrait être transloquée dans le noyau pour y exercer des fonctions spécifiques. Nous n'avons pas été en mesure de détecter une forme nucléaire de HDAC6 dans nos conditions expérimentales. Il est donc tentant d'envisager que la protéine SC35, malgré la présence d'un signal de rétention nucléaire au niveau de son domaine RS, puisse être exportée dans le cytoplasme pour y être dégradée, compartiment dans lequel HDAC6 exercerait son rôle protecteur vis-à-vis de la protéolyse de SC35. En accord avec cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de fractionnement sub-cellulaire noyau/cytoplasme dans les cellules traitées par le NaBu. Nos résultats préliminaires indiquent que le niveau protéique de SC35 augmente dans le cytoplasme des cellules traitées, suggérant que SC35 puisse dans certaines conditions se retrouver dans le cytoplasme. Finalement, nous montrons que SC35 s'accumule encore dans les cellules surexprimant Tip60 lorsque HDAC6 est co-exprimé, indiquant que l'activité de HDAC6 surpasse celle de Tip60. Ces données soutiennent donc un modèle hypothétique dans lequel le ratio entre l'activité de ces deux enzymes serait un déterminant critique pour l'expression et les fonctions biologiques de SC35 (cf §5 + **Figure 22**).

#### **I.4. Relation inverse entre le degré de phosphorylation et le niveau d'acétylation de SC35**

La modulation du niveau de phosphorylation des protéines SR contrôle leur activité, leur spécificité et leur localisation subcellulaire. Plusieurs kinases, dont SRPK1, SRPK2, CLK/STY ou la topoisomérase I, ont été décrites comme phosphorylant les protéines SR. Cependant, peu de données renseignant les signaux d'amont qui activent ces kinases ou leur spécificité vis-à-vis de telle ou telle protéine SR existent à ce jour. Les kinases SRPK1 et SRPK2 sont les kinases des protéines SR les mieux caractérisées. Elles sont majoritairement localisées dans le compartiment cytoplasmique mais peuvent, sous certaines conditions, être transloquées dans le noyau (Wang *et al*, 1998b; Ding *et al*, 2006). Leur rôle dans l'import nucléaire et dans la localisation subnucléaire des protéines SR a été documenté (Gui *et al*, 1994; Yeackley *et al*, 1999). Nous montrons que SRPK1 et SRPK2 contribuent à la phosphorylation de SC35 dans des lignées cellulaires dérivées de carcinomes pulmonaires humains. Nous démontrons également que Tip60 diminue la phosphorylation de SC35 par un mécanisme nécessitant son activité HAT. Ce résultat atteste d'une corrélation inverse entre le statut d'acétylation et le statut de phosphorylation et suggère que les voies de signalisation contrôlant l'acétylation et la phosphorylation de SC35 pourraient être imbriquées. Il a été proposé que, de la même manière que les signaux de phosphorylation affectent l'acétylation d'une lysine adjacente, l'acétylation des lysines pourrait aussi réguler la phosphorylation de résidus sérine proches ou distants (pour revue, Yang & Seto, 2008), renforçant de ce fait l'idée d'une interconnexion étroite entre les réseaux de phosphorylation et d'acétylation. Par ailleurs, des travaux récents ont montré que la phosphorylation du domaine RS de SF2/ASF nécessite les modules RRM (Hagopian *et al*, 2008; Ngo *et al*, 2008). Basé sur ces données, une hypothèse est que l'acétylation de SC35 par Tip60 à l'intérieur de son domaine RRM interfère avec sa phosphorylation médiée par les SRPKs. Les données de la littérature indiquent que les protéines SR qui sont exportées dans le cytoplasme pour y être dégradées subissent une étape préliminaire de déphosphorylation nucléaire. Les travaux de Lin et collègues ont mis en évidence que SC35 n'est pas capable d'être transloquée dans le cytoplasme du fait de sa résistance à l'action de phosphatases (Lin *et al*, 2005). Cette résistance pourrait être liée soit une conformation de la protéine qui empêche l'accès de ces enzymes aux sites de phosphorylation, soit au recrutement de co-facteurs qui masquent le domaine RS (Tenenbaum & Aguirre-Ghiso, 2005). Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que l'acétylation de SC35 au niveau de son domaine RRM pourrait être un pré-



requis à sa déphosphorylation, son export nucléaire et sa dégradation via le protéasome cytoplasmique. Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ce contexte restent cependant à être élucidés.

Par ailleurs, nous démontrons que Tip60 contrôle négativement la translocation nucléaire de SRPK1 et SRPK2 par un mécanisme restant à déterminer. Ces résultats permettent d'envisager que la distribution subcellulaire inappropriée des kinases SRPKs dépendante de l'expression de Tip60 pourrait aussi contribuer à son effet négatif sur la phosphorylation de SC35. De façon intéressante, l'étude menée par Choudhary et collègues révèle que SRPK1 est également une cible d'acétylation (Choudhary *et al*, 2009), suggérant que Tip60 pourrait contrôler la localisation et les activités des SRPKs par un mécanisme mettant en jeu leur acétylation. La séquence « spacer » qui sépare les deux domaines kinases conservés de SRPK1 et SRPK2 est impliquée dans le partitionnement de ces enzymes entre le cytoplasme et le noyau (Ding *et al*, 2006). Il reste donc à déterminer si Tip60 est capable de cibler directement ou indirectement ce domaine auxiliaire pour affecter l'accumulation nucléaire des SRPKs.

## **I.5. La voie de signalisation Tip60/HDAC6/SC35 = un rôle différent selon le signal « d'activation » via le contrôle des modifications post-traductionnelles de SC35**

### **I.5.1 SC35 hyperphosphorylée et hypoacétylée : une protéine apoptotique en réponse aux stress génotoxiques**

Nos travaux mettent en évidence un rôle majeur de la protéine SC35 au cours de la réponse aux dommages de l'ADN. Nous démontrons que SC35 s'accumule dans des lignées cellulaires issues de carcinomes pulmonaires traitées au cisplatine. Cette accumulation a lieu au niveau post-transcriptionnel puisque le niveau des ARNm codant pour SC35 n'augmente pas dans les cellules traitées. Pourtant, des données du laboratoire indiquent que E2F1 est nécessaire à l'accumulation de SC35 dans ces conditions. Puisque nous montrons qu'à l'inverse, E2F1 contrôle l'accumulation de SC35 en réponse au cyclophosphamide au niveau transcriptionnel, ces résultats indiquent que les mécanismes moléculaires mettant en jeu E2F1 et contrôlant l'expression de SC35 sont différents en fonction du type de stress génotoxique. De façon importante, nous montrons que SC35 s'accumule sous une forme hypoacétylée et hyperphosphorylée dans les cellules traitées par le cisplatine. De telles modifications post-traductionnelles de SC35 corrèlent avec une forte diminution des niveaux de la protéine Tip60

et de son transcrit, de même qu'avec l'accumulation nucléaire des kinases SRPK1 et SRPK2. Les données actuelles de la littérature soulignent le rôle crucial joué par Tip60 au cours de la réponse aux dommages de l'ADN (pour revue, Squatrito *et al*, 2006) et des niveaux élevés de la protéine Tip60 ont été corrélées à la résistance au cisplatine dans différentes lignées cellulaires de carcinomes humains (Miyamoto *et al*, 2008). Nos résultats sont donc cohérents avec un modèle dans lequel l'apoptose induite en réponse au cisplatine implique une diminution d'expression de Tip60 associée à l'accumulation de SC35 sous forme phosphorylée. De plus, puisque HDAC6 est requis pour la stabilisation de SC35 dans ce contexte, le ratio Tip60/HDAC6 joue un rôle déterminant dans le contrôle de l'expression de SC35 en réponse au cisplatine. De façon importante, nous démontrons que la kinase SRPK2 contrôle la phosphorylation de SC35 mais également qu'elle détermine le devenir de la cellule (arrêt du cycle cellulaire versus apoptose). SRPK1 semble avoir des fonctions antagonistes puisque sa neutralisation augmente plutôt qu'inhibe l'apoptose. Il convient de noter qu'un tel rôle de SRPK1 dans la résistance au cisplatine a été rapporté dans des carcinomes pancréatiques (Hayes *et al*, 2007). Nos travaux mettent donc clairement en évidence des fonctions non redondantes de chaque SRPK et soutiennent un rôle critique de la phosphorylation de SC35 médiée par SRPK2 dans l'induction de l'apoptose après traitement au cisplatine. Puisque le développement d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant les deux kinases SRPK est en cours (Szekelyhidi *et al*, 2005; Karakama *et al*, 2010), nos travaux suggèrent aussi que le développement d'inhibiteurs sélectifs pour l'une ou l'autre des SRPKs pourrait être nécessaire. Dans les clones stables et inductibles surexprimant E2F1 ou les cellules traitées par le cyclophosphamide, nous n'avons pas analysé le statut acétylé de SC35, ni le rôle de sa phosphorylation par SRPK2. Il serait sans doute intéressant de faire ces expériences afin de rechercher si l'accumulation de SC35 sous une forme hypoacétylée et hyperphosphorylée est un processus général en réponse à différents stress génotoxiques ou stimuli apoptotiques.

Quelque soit le stress génotoxique, nous montrons que SC35 est indispensable à l'apoptose induite par ces stress et module l'épissage alternatif des caspases et/ou Bcl-x en faveur des isoformes pro-apoptotiques. De façon intéressante, selon le stress considéré, les cibles diffèrent puisque le cisplatine affecte principalement l'épissage de la caspase-8 alors que le cyclophosphamide affecte l'épissage de la caspase-9 et Bcl-x. Ainsi, bien que SC35 s'accumule sous forme hyperphosphorylée dans ces conditions, il est toujours capable d'affecter l'épissage de ces gènes. Puisqu'il est connu depuis longtemps que le « turn-over »

phosphorylation/déphosphorylation est indispensable à l'activité des protéines SR au sein du spliceosome, des expériences supplémentaires seraient donc nécessaires pour approfondir les mécanismes d'action de cette forme hyperphosphorylée de SC35 en coopération avec E2F1 dans le contexte du spliceosome. Il est possible que cette forme hyperphosphorylée contrôle l'épissage en agissant à un autre niveau que la machinerie d'épissage « *per se* ». Bien que quelques études aient déjà rapporté un rôle des protéines SR dans la réponse aux stress génotoxiques, c'est, à notre connaissance, la première preuve que SC35 joue un rôle dans la réponse aux dommages de l'ADN. Il a été récemment mis en évidence que les protéines SR sont capables de se lier à la chromatine. Puisque nous avons obtenu des résultats démontrant que SC35 interagit avec Tip60, nous émettons maintenant l'hypothèse selon laquelle SC35 pourrait être recrutée au niveau des complexes initiateurs de la réponse aux dommages de l'ADN. Un tel rôle pourrait être cohérent avec un rôle déjà proposé des protéines SR dans le maintien de la stabilité génomique. Nos résultats ouvrent donc la voie à de futures investigations concernant le rôle des protéines liant l'ARN dans le contrôle de la stabilité du génome, ainsi que leur implication en tant que déterminants de la réponse des cellules tumorales aux agents chimiothérapies.

### **I.5.2 SC35 hyperacétylée et hypophosphorylée : une protéine médiant la sénescence en réponse aux HDACi**

L'induction de l'expression de certaines protéines SR après traitement par des inhibiteurs d'histones déacétylases (HDACi) tels que le sodium butyrate (NaBu) et l'acide valproïque a déjà été rapportée dans des modèles cellulaires non tumoraux (Chang *et al*, 2001; Brichta *et al*, 2003; Nissim-Rafinia *et al*, 2004), même si les mécanismes moléculaires par lesquels les protéines SR s'accumulent en réponse à ces traitements n'ont pas encore été élucidés. Nous montrons que SC35 est spécifiquement induite dans différentes lignées cellulaires dérivées de carcinomes pulmonaires traitées au NaBu. Nous n'avons pas observé de variation significative du niveau des transcrits codant pour SC35, indiquant que, de la même manière qu'en réponse au cisplatine, l'accumulation de SC35 après traitement au NaBu est liée à une augmentation de sa stabilité protéique. D'ailleurs, nous mettons en évidence que le mécanisme d'induction de SC35 par le NaBu met en jeu les mêmes acteurs que lors de son induction par le cisplatine, à savoir Tip60 et HDAC6. Ainsi, nous montrons que SC35 s'accumule sous une forme acétylée en réponse au NaBu, que cette accumulation corrèle avec une augmentation de l'expression de Tip60, et qu'elle nécessite la présence de HDAC6. Ces

données renforcent l'idée d'un rôle fondamental d'une régulation post-traductionnelle de la protéine SC35 via la balance entre les activités de Tip60 et de HDAC6 pour le contrôle de son expression mais aussi de ses fonctions biologiques puisque dans ces conditions, l'accumulation de SC35 sous forme hyperacétylée et hypophosphorylée participe à un processus de sénescence, plutôt qu'à l'apoptose. De façon importante, en réponse au NaBu, la phosphorylation de SC35 est atténuée, et coïncide avec une diminution de la localisation nucléaire des kinases SRPKs. Nous retrouvons donc une corrélation inverse entre le niveau d'acétylation et de phosphorylation de SC35, indiquant que l'une de ces modifications post-traductionnelles se répercute sur l'autre, et/ou inversement.

Les HDACi sont connus pour avoir des activités anti-tumorales, via notamment l'inhibition de la croissance cellulaire, l'induction de l'apoptose et/ou la mise en place d'un état de sénescence. Cependant, les cibles moléculaires de ces HDACi sont encore très mal connues. Un des gènes les plus fréquemment induits par les HDACi code pour la protéine  $p21^{WAF1}$ , un inhibiteur des complexes CDK/cycline qui joue un rôle déterminant dans l'arrêt du cycle cellulaire. Jusqu'alors, aucune étude n'avait rapporté de lien entre HDACi et protéines SR dans les cancers. Nos travaux identifient un mécanisme coopératif entre les protéines SC35 et Tip60 pour contrôler l'accumulation de  $p21^{WAF1}$  à la fois au niveau ARN et protéique, et pour déclencher un arrêt du cycle en G2/M en réponse au sodium butyrate. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire indiquent que SC35 stimule l'activité du promoteur de  $p21^{WAF1}$ . De plus, il est connu que Tip60 peut être recruté au niveau de ce promoteur et agit comme un co-activateur de ce gène. Ainsi, nous postulons que SC35 et Tip60 pourraient stimuler conjointement l'activité du promoteur de  $p21^{WAF1}$ . Des expériences supplémentaires de CHIP devraient permettre de déterminer si SC35 est présent au niveau de ce promoteur et dans quelle mesure Tip60 participe à ce recrutement. De façon importante, nous montrons également que les deux protéines SC35 et Tip60 sont nécessaires à l'induction d'un phénotype de sénescence cellulaire après un traitement de longue durée des cellules tumorales au NaBu. A notre connaissance, ces résultats sont la première évidence d'un rôle de SC35 dans le processus de sénescence. La sénescence induite par le NaBu est une sénescence prématurée. Il serait donc intéressant de rechercher si SC35 est aussi impliqué dans la sénescence répliquative liée au raccourcissement télomérique. Dans ce contexte, l'observation que le niveau protéique de SC35 augmente dans des fibroblastes en culture au fur et à mesure de leur passage (Ito *et al*, 1998) supporte un rôle plus large de cette protéine dans les processus de sénescence. Par ailleurs, les oncogènes sont capables d'induire la sénescence.

Dans la mesure où nous identifions SC35 comme une cible transcriptionnelle de E2F1 et que E2F1 est aussi capable d'induire la sénescence sous certaines conditions, il reste à déterminer si SC35 pourrait aussi jouer un rôle dans cette sénescence médiée par E2F1.

### **I.6. Vers un effet synergique possible de SC35 dans la réponse des cellules tumorales aux traitements conventionnels (chimiothérapies) et non conventionnels (HDACi)**

L'ensemble des données que nous avons obtenu démontre que la protéine SR SC35 est nécessaire à l'inhibition de croissance cellulaire (apoptose ou sénescence) dans des cellules du cancer du poumon traitées par des agents chimiothérapeutiques ou par un HDACi, le sodium butyrate. Ces travaux soulignent donc le rôle crucial d'une protéine SR dans la réponse des cellules tumorales aux traitements actuellement utilisés en clinique humaine. Le sodium butyrate est une molécule largement utilisée dans les études « *in vitro* » sur modèles cellulaires mais son utilisation a été abandonnée dans les essais cliniques du fait de sa demi-vie relativement courte. Il serait donc important d'étudier le rôle de SC35 dans la réponse des cellules tumorales à d'autres HDACi de la même famille actuellement employés en clinique humaine, tels que l'acide valproïque. En outre, puisque nous avons montré l'importance de SC35 dans la réponse des cellules cancéreuses au cisplatine, un agent chimiothérapeutique largement utilisé en première ligne de traitement des tumeurs solides, il est tentant de spéculer que SC35 puisse moduler l'action des traitements anticancéreux actuels basés sur l'association de drogues chimiothérapeutiques conventionnelles et d'inhibiteurs de HDACs. Dans ce cadre, il faut noter que les cellules sénescents sont souvent plus résistantes à l'apoptose. Des investigations supplémentaires sont donc à entreprendre afin de définir dans quelle mesure SC35 pourrait participer à l'effet synergique obtenu lors d'un traitement anti-tumoral alliant ces deux types de molécules.

## II. SC35 et E2F1 : deux partenaires pour le contrôle de grandes fonctions biologiques

### II.1. SC35 : une nouvelle cible transcriptionnelle directe de E2F1

Comme déjà mentionné, très peu de données existent concernant les facteurs protéiques qui contrôlent l'expression des protéines SR et notamment l'implication des facteurs de transcription dans ce contrôle. La famille des facteurs de transcription E2F avait été impliquée dans le contrôle de l'expression de certaines protéines SR (dont SRp30c, SRp20 et 9G8) via des études de « macro-array » et d'immunoprécipitation de la chromatine identifiant des séquences consensus de fixation des E2Fs sur le promoteur de ces gènes (Muller *et al*, 2001; Ren *et al*, 2002; Young *et al*, 2003). Cependant, aucune étude n'avait jusqu'à présent recherché le rôle potentiel des protéines SR dans les processus cellulaires contrôlés par les protéines de la famille E2F comme la prolifération ou l'apoptose.

Dans ce travail, nous avons identifié la protéine SR SC35 comme une cible transcriptionnelle directe de E2F1. Nous avons ainsi démontré la capacité de E2F1 à augmenter spécifiquement l'ARNm codant pour SC35 dans nos modèles cellulaires de carcinomes pulmonaires surexprimant E2F1. De plus, nous avons montré par des expériences de ChIP dans des cellules asynchronisées que E2F1 est capable de se lier au promoteur de *sc35* et de le transactiver. De façon intéressante, l'affinité de fixation de E2F1 sur le promoteur de *sc35* augmente en réponse au traitement des cellules par le cyclophosphamide, indiquant que la liaison de E2F1 à ce promoteur est stimulée au cours du processus apoptotique.

Nos résultats décrivent le premier lien fonctionnel entre E2F1 et un facteur d'épissage. Il reste à déterminer si l'expression et/ou les fonctions d'autres protéines SR pourraient être contrôlées par E2F1. Il a été montré que E2F1 est capable de réguler l'expression de la protéine SRp20 au cours du cycle cellulaire (Jumaa *et al*, 1997). Cependant, dans nos modèles cellulaires, le niveau d'expression de la protéine SRp20 et d'autres protéines SR n'est pas affecté par la surexpression ou la baisse d'expression de E2F1. Il est donc possible que la régulation des protéines SR médiée par E2F1 ou d'autres facteurs E2Fs dépende du contexte tissulaire, cellulaire et/ou des co-signaux d'amont reçus par la cellule.

## II.2. SC35 et E2F1 coopèrent pour induire l'apoptose en réponse aux agents génotoxiques

Nous montrons que E2F1 régule en amont l'expression de SC35, notamment en réponse au traitement par le cyclophosphamide. Les deux protéines coopèrent pour induire l'apoptose puisque la neutralisation de SC35 par ARNi dans nos cellules inhibe l'apoptose induite en réponse à E2F1, et prévient les modifications des patrons d'épissage de la caspase-9 et de Bcl-x détectées dans les cellules traitées. Ces travaux identifient donc un nouveau mécanisme par lequel E2F1 induit l'apoptose, via le contrôle de l'épissage alternatif de gènes apoptotiques. L'implication de certains facteurs d'épissage dans les processus apoptotiques a été rapportée. Par exemple, la perte de SF2/ASF induit l'apoptose (Li *et al*, 2005), indiquant que SF2/ASF est une protéine anti-apoptotique dans certains modèles. A l'inverse, une autre étude démontre que l'expression ectopique de SC35 modifie l'épissage alternatif de l'ARNm de la *caspase-2* en faveur de son isoforme pro-apoptotique et induit l'apoptose (Jiang *et al*, 1998). Ces données soulignent le rôle différentiel des protéines SR dans la régulation de l'apoptose qui pourrait dépendre du type cellulaire, mais aussi des voies de signalisation qui régulent en amont l'expression et l'activation de ces facteurs d'épissage au cours du processus apoptotique. Il convient de noter que certains des gènes dont l'épissage est modifié par E2F1 sont des gènes ciblés transcriptionnellement par E2F1 (caspase-9), suggérant l'existence d'un double niveau de contrôle pour induire l'apoptose qui pourrait mettre en jeu un couplage transcription/épissage. En accord avec cette hypothèse, nous montrons que les deux protéines E2F1 et SC35 interagissent. L'interaction de facteurs de transcription avec des composants de la machinerie du spliceosome a été rapportée, et le rôle de ces facteurs de transcription dans les événements d'épissage démontré (Hallier *et al*, 1998; Guillouf *et al*, 2006). Par exemple, le facteur de transcription Spi-1/PU.1 est capable de modifier l'épissage de certains de ses gènes cibles, indépendamment de sa capacité à les transactiver. Nous savons que la liaison à l'ADN de E2F1 est nécessaire à son activité sur le profil d'épissage. Il nous reste donc à définir si son activité transactivatrice est requise dans ce contexte. Nous avons identifié les sites d'interaction de SC35 sur E2F1 et caractérisé deux sites de liaison : le premier site correspond au domaine de liaison à l'ADN de E2F1 (acides aminés 120-191), et le second, plus faible, correspond à l'extrémité C-terminale de E2F1 (acides aminés 284-437) qui englobe le domaine de liaison à RB. Nous avons recherché si la surexpression de SC35 modifiait la capacité de E2F1 à lier l'ADN au niveau de séquences canoniques. Nous n'avons pas observé d'effet de SC35 dans ce cas. Il est cependant possible que cet effet soit restreint à

certaines gènes cibles. A ce stade, différentes hypothèses peuvent donc être émises concernant les mécanismes moléculaires par lesquels E2F1 et SC35 coopèrent pour réguler l'épissage alternatif. E2F1 pourrait permettre le recrutement de SC35 au niveau du promoteur de certains de ses gènes cibles et affecter par ce biais l'épissage et/ou le niveau de transcrit. De façon intéressante, nous avons réalisé des expériences de ChIP et retrouvé SC35 au niveau du promoteur de certains gènes apoptotiques dont *c-flip*. Il est également possible que E2F1 recrute d'autres composants du spliceosome, voire même d'autres protéines SR. Alternativement, E2F1 et SC35 pourraient affecter la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II au niveau de gènes spécifiques en modifiant la phosphorylation de son domaine CTD, comme récemment suggéré pour E2F1 (Ma *et al*, 2010) et démontré pour SC35 (Lin *et al*, 2008).

### **II.3. SC35 contrôle les fonctions prolifératives de E2F1**

En accord avec le fait que SC35 est une cible transcriptionnelle directe de E2F1, nous montrons que l'ARN et le niveau protéique de SC35 varient au cours du cycle cellulaire, avec un pic lors de la transition G1/S et la progression en phase S coïncidant avec l'augmentation de l'expression de la protéine E2F1 et de certaines de ses cibles régulant la phase S. Nos résultats démontrent donc que SC35 est une protéine qui cycle. Il serait maintenant intéressant de vérifier si le recrutement de E2F1 au niveau du promoteur de SC35 varie lui aussi au cours du cycle cellulaire, afin de savoir si cette régulation de SC35 est bien dépendante de E2F1. En outre, il serait également intéressant de tester le niveau de phosphorylation de SC35 dans ce contexte. Nous montrons que la neutralisation de SC35 par ARN interférence diminue le nombre de cellules en phase S, et inversement, sa surexpression augmente le nombre de cellules en phase S. De plus, la déplétion de SC35 prévient l'incorporation de BrdU, donc la réplication de l'ADN. Ces données mettent pour la première fois en évidence un rôle de SC35 dans le contrôle de la progression en phase S de cellules tumorales, même si un rôle dans le contrôle de la transition G2/M a été récemment décrit dans des MEF (Xiao *et al*, 2007). De façon importante, nos travaux identifient certains des gènes cibles de SC35 dans ce contexte puisque sa neutralisation ou sa surexpression dans nos modèles d'étude affecte le niveau d'expression des protéines cycline E, DHFR ou thymidylate synthétase (TS), toutes impliquées dans les processus de réplication de l'ADN et gènes cibles de E2F1. Dans ce contexte, nous montrons que SC35 potentialise l'activité transactivatrice de E2F1 au niveau



des promoteurs cycline E et p45<sup>SKP2</sup>. Ces résultats suggèrent qu'au cours de la prolifération, SC35 pourrait agir comme un co-activateur transcriptionnel de E2F1 (**Figure 21**). Récemment, un rôle de SC35 en tant que stimulateur de l'élongation de la transcription de gènes spécifiques a été rapporté (Lin *et al*, 2008). S'il s'avère que SC35 est effectivement recruté au niveau du promoteur de certains gènes via E2F1 et stimule l'activité transactivatrice de ce dernier, SC35 pourrait donc aussi jouer un rôle positif sur l'étape d'initiation de la transcription. Nous avons recherché la fixation de SC35 par CHIP sur les promoteurs de cycline E ou DHFR dans nos modèles cellulaires, sans succès. Ces expériences seraient à réitérer dans des cellules synchronisées car il se peut que la fixation de SC35 sur ces promoteurs soit dépendante du cycle. Par quels mécanismes SC35 modifie-t-il l'activité transcriptionnelle de E2F1 ? Nous avons obtenu des résultats préliminaires montrant que sa neutralisation prévient la fixation de E2F1 sur le promoteur de la cycline E. Ces résultats suggèrent que SC35 pourrait être nécessaire au recrutement de E2F1 au moins au niveau de certains promoteurs. Il reste aussi à approfondir le rôle de SC35 dans le modèle proposé par Tyagi et coll. d'activation transcriptionnelle de E2F1 au niveau des promoteurs de gènes impliqués en phase S, mettant en jeu notamment HCF-1 (Tyagi *et al*, 2007). Nous avons montré « *in vitro* » que SC35 se lie à E2F1 au niveau de l'extrémité C-terminale incluant le domaine de liaison à RB, suggérant que SC35 pourrait aussi inhiber l'activité de RB envers E2F1, en rentrant peut-être en compétition avec RB pour la fixation à E2F1. De façon intéressante, nous avons obtenu des résultats préliminaires indiquant que SC35 est capable de contrôler négativement le niveau d'expression de RB dans certains modèles cellulaires. Cependant, comme les cellules issues de tumeurs pulmonaires neuroendocrines ont inactivé RB, ces résultats suggèrent que les effets de SC35 sur les gènes cibles de E2F1 dans ces modèles sont indépendants de RB.

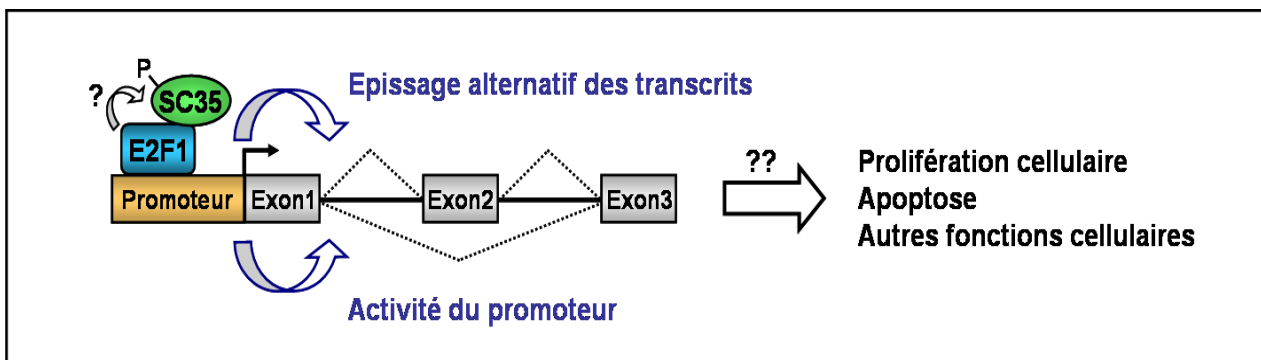
Il est connu que l'activité de promoteurs cibles de E2F1 est étroitement contrôlée par des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. Notamment, Tip60 est recruté au niveau de certains de ces promoteurs et stimule leur activité (Taubert *et al*, 2004). Finalement, sur la base de nos résultats démontrant un lien direct entre SC35 et Tip60, il est aussi tentant de spéculer que SC35 et Tip60 pourraient dans certains cas contrôler l'activation transcriptionnelle de promoteurs dépendants de E2F1 au cours du cycle cellulaire.

Nous montrons que la voie dépendante de la kinase AKT contrôle la phosphorylation de SC35 dans des modèles cellulaires dérivés de tumeurs pulmonaires neuroendocrines de haut grade de malignité. Ces résultats sont importants puisqu'ils indiquent que les kinases

impliquées dans la phosphorylation de SC35 sont différentes selon le type cellulaire. De plus, cette voie est nécessaire à la potentialisation de la fonction transactivatrice de E2F1 par SC35, puisque son inhibition prévient l'effet positif de SC35 sur l'activité transcriptionnelle de E2F1 au niveau du promoteur de la cycline E. De façon importante, l'inactivation pharmacologique d'AKT dans les modèles cellulaires de tumeurs neuroendocrines pulmonaires provoque une forte diminution de la forme phosphorylée de SC35 associée à la chromatine, concomitante à une baisse drastique du niveau d'expression de la cycline E. Même si ces résultats demandent à être confirmés, ils indiquent que la forme phosphorylée de SC35 est présente à la chromatine et suggèrent que la phosphorylation de SC35 par une voie dépendante d'AKT pourrait être nécessaire à son rôle de co-activateur transcriptionnel au niveau de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire.

#### II.4. Un modèle hypothétique de coopération entre E2F1 et SC35 pour le contrôle de fonctions biologiques essentielles

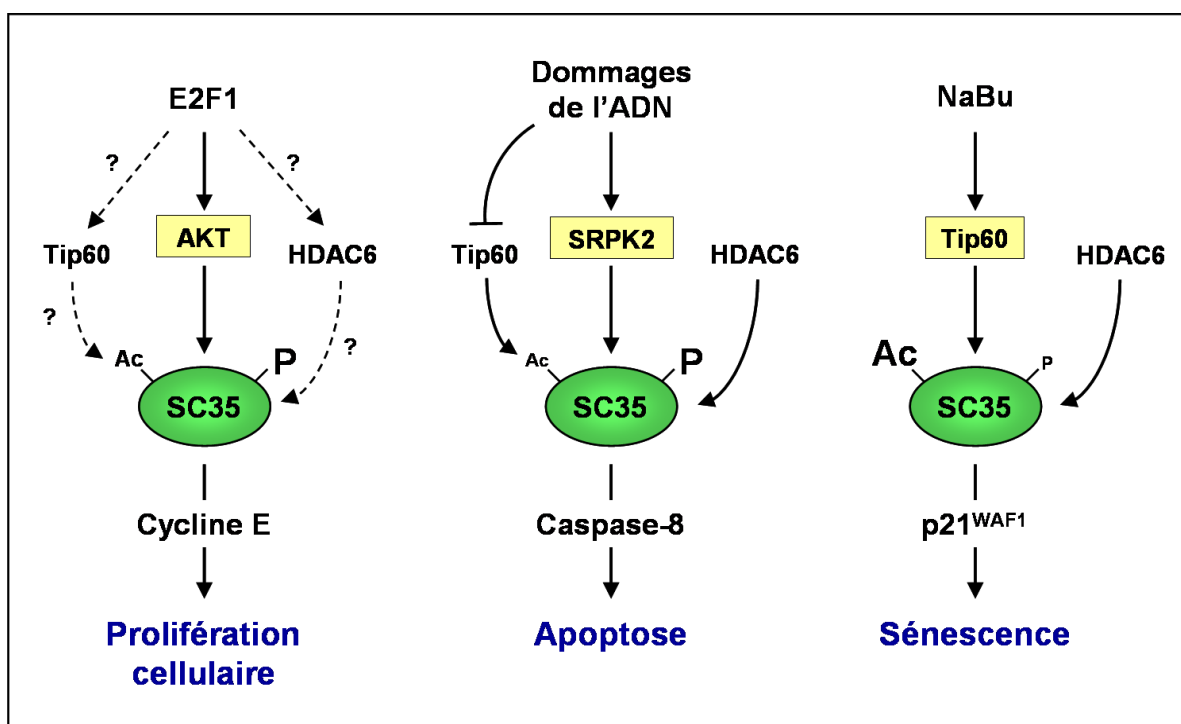
Sur la base du couplage transcription/épissage, nous pouvons donc proposer un modèle hypothétique de travail (**Figure 21**). Dans ce modèle, l'interaction de E2F1 avec SC35 pourrait affecter la nature de l'épissage alternatif des transcrits mais aussi l'activité de promoteurs cibles de E2F1. En fonction du type cellulaire envisagé, des signaux associés, des interactions protéine-protéine et du type de promoteur ciblé, cette modulation pourraient stimuler l'activité proliférative et/ou apoptotique de E2F1.



**Figure 21 : Hypothèse de travail basée sur le couplage transcription/épissage.**

Via sa liaison à E2F1, la protéine SC35 pourrait être recrutée au niveau du promoteur de certains gènes cibles de E2F1. Selon le gène envisagé et les signaux associés, ce recrutement pourrait contribuer à la régulation de l'épissage alternatif du transcrit de ce gène, déterminant ainsi le type d'isoforme protéique produit, ou modifier l'activité transactivatrice de E2F1 au niveau de ce promoteur, conditionnant le niveau de transcrit produit. Ainsi, SC35 participerait aux activités prolifératives, apoptotiques, ou aux autres fonctions cellulaires de E2F1.

En conclusion, l'ensemble de nos travaux identifie un rôle de la protéine SR SC35 dans le contrôle de fonctions biologiques essentielles, telles que la prolifération cellulaire, l'apoptose et la sénescence. De façon importante, nous montrons que la contribution de SC35 à l'un ou l'autre de ces processus dépend du type de signal activateur mais également du type de modifications post-traductionnelles portées par SC35. De plus, nous identifions dans chaque cas des cibles de SC35 distinctes (**Figure 22**). Ces différentes observations mettent en avant un rôle multifonctionnel de la protéine SC35 et permettent maintenant d'envisager le rôle de ces modifications post-traductionnelles de SC35, tant au cours de la progression tumorale des cancers bronchiques, que dans leur réponse aux thérapies.



**Figure 22 : Rôle multifonctionnel de la protéine SC35 : importance du statut de ses modifications post-traductionnelles.**

La participation de la protéine SC35 à de grandes fonctions cellulaires dépend du type de signal activateur en amont et du type de modifications post-traductionnelles. Ainsi, la phosphorylation de SC35 par la kinase AKT suite à un stress oncogénique (E2F1) conditionne son activité dans la prolifération cellulaire, via notamment l'induction de la cycline E. Par ailleurs, sa phosphorylation par SRPK2 en réponse à des dommages de l'ADN causés par le cisplatine permet d'engendrer un processus apoptotique à travers la modulation du ratio caspase-8L/caspase-8a en faveur des isoformes pro-apoptotiques. Enfin, en réponse au sodium butyrate (NaBu), l'induction de Tip60 conduit à l'accumulation de SC35 sous une forme acétylée et hypophosphorylée, laquelle permet d'engager un processus de sénescence via notamment l'induction de p21<sup>WAF1</sup>. Dans tous les cas, la balance entre les activités de Tip60 et HDAC6 joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'expression et/ou l'activité de SC35. Les pointillés indiquent les relations restant à approfondir entre les différents partenaires mentionnés pour une fonction biologique donnée.

### III. Implication des fonctions identifiées de SC35 au cours du processus de carcinogenèse bronchique

Il a été proposé que des modifications affectant l'expression et/ou l'activité des protéines SR contribuent à la carcinogenèse. À l'heure actuelle, aucune donnée n'existe concernant le niveau d'expression de SC35 et/ou de sa forme phosphorylée dans une large série de tumeurs pulmonaires. Cependant, il a récemment été montré que SF2/ASF était surexprimé dans une série de tumeurs du poumon et du colon (Karni *et al*, 2007), via notamment une amplification du gène. De plus, certaines protéines SR, dont SRp20, sont surexprimées dans le cancer du sein (Stickeler *et al*, 1999). Ces données sont en accord avec une expression anormale des protéines SR dans les tumeurs humaines, susceptibles de conditionner en aval des anomalies d'épissage.

Nous avons entrepris une étude à large échelle de l'expression des protéines SC35 et P-SC35 par immunohistochimie (IHC) dans les tumeurs bronchiques humaines de différents types histologiques. Dans ces tumeurs, l'étude du statut de Tip60 a aussi été initiée au laboratoire afin de rechercher d'éventuelles corrélations avec le niveau d'expression de SC35. Le statut de HDAC6 n'a pas encore été étudié. Malheureusement, faute d'outils performants (anticorps), l'étude du statut acétylé de SC35 n'est à l'heure actuelle pas possible dans les tumeurs. Les résultats que nous avons obtenus sur 86 carcinomes pulmonaires non à petites cellules incluant 48 carcinomes malpighiens et 38 adénocarcinomes indiquent que SC35 s'accumule sous une forme phosphorylée dans la majorité de ces tumeurs comparativement au tissu normal associé. Dans la mesure où ces tumeurs, et notamment les adénocarcinomes, expriment de faibles niveaux d'expression de E2F1 (Eymin *et al*, 2001), ces données suggèrent que d'autres régulateurs (autres facteurs de la famille E2F ?) pourraient intervenir dans le contrôle de l'expression de SC35 et contribuer à la dérégulation de son niveau d'expression. Dans nos modèles cellulaires issus de carcinomes non à petites cellules, nous avons identifié SRPK1 et SRPK2 comme les kinases phosphorylant majoritairement SC35. De façon intéressante, nous avons aussi observé que SRPK1 et SRPK2 sont surexprimées dans les tumeurs bronchiques comparativement au tissu normal. Dans les lignées cellulaires, nous avons montré que l'accumulation de SC35 sous forme phosphorylée contribue à l'apoptose en réponse au cisplatine. Il reste donc à comprendre pourquoi SC35, qui s'accumule dans les tumeurs bronchiques sous forme phosphorylée, n'induit pas l'apoptose de ces cellules. Une des possibilités est que l'expression en quantité suffisante de E2F1 est

nécessaire aux fonctions apoptotiques de SC35, via notamment l'activation de voies de signalisation définies (activées par exemple en réponse au cisplatine) et/ou le ciblage de SC35 au niveau de gènes spécifiques. La faible expression de E2F1 détectée dans les tumeurs pulmonaires non à petites cellules pourrait donc favoriser leur survie par perte d'une fonction pro-apoptotique. Nous avons montré que la phosphorylation de SC35 par la kinase SRPK2 est requise pour l'apoptose induite en réponse au cisplatine. Une autre possibilité est donc que l'hyperphosphorylation de SC35 observée dans ces tumeurs ne soit pas causée par SRPK2, bloquant ainsi les signaux apoptotiques au profit d'un processus prolifératif. Il sera donc nécessaire de définir dans quelle proportion l'une ou l'autre des kinases SRPK1/SRPK2 participe à la phosphorylation de SC35 dans les tumeurs bronchiques.

Le rôle de SC35 dans la sénescence doit aussi être envisagé au cours du processus de carcinogenèse bronchique. En effet, nous avons montré qu'une forme hyperacétylée mais hypophosphorylée de SC35 contribue au processus de sénescence. La sénescence est une barrière à la progression tumorale que les cellules tumorales doivent contourner pour continuer leur prolifération cellulaire. Puisque nos résultats montrent que SC35 s'accumule sous une forme hyperphosphorylée dans les tumeurs, il reste à définir quand cette phosphorylation survient, et notamment à rechercher si les lésions pré-néoplasiques bronchiques accumulent déjà SC35 sous une forme phosphorylée. De façon importante, les résultats préliminaires concernant l'expression de Tip60 dans ces tumeurs indiquent une baisse d'expression de Tip60 qui pourrait expliquer pourquoi SC35 s'accumule sous forme hyperphosphorylée dans les tumeurs et qui pourrait être consistante avec un « by-pass » du processus de sénescence. Il sera donc très intéressant d'étudier le statut de HDAC6 dans ce contexte.

Nous avons commencé à étendre ces études IHC aux tumeurs pulmonaires neuroendocrines. Les résultats préliminaires obtenus sur une petite série comprenant 12 carcinomes neuroendocrines à grandes cellules et 15 carcinomes à petites cellules révèlent une surexpression de SC35 et de sa forme phosphorylée dans 89 % et 78 % des tumeurs respectivement, comparativement au tissu sain associé. Ces données indiquent que SC35 pourrait contribuer à la pathogenèse de ces tumeurs de haut grade de malignité. Nous n'avons pas observé de corrélation directe entre le niveau d'expression de SC35 ou de sa forme phosphorylée et le niveau d'expression de E2F1 dans ces tumeurs, indiquant là encore, que la dérégulation de SC35 ne dépendrait pas de l'activation transcriptionnelle par E2F1. A l'inverse, nous avons constaté une corrélation directe très significative ( $p=0,0083$ ) entre le

statut de phosphorylation de SC35 et le niveau d'expression de la cycline E dans cette même série de tumeurs. S'ils demandent à être confirmés sur un plus grand nombre de tumeurs, ces résultats obtenus « *in situ* » confirment les résultats obtenus sur lignées cellulaires en faveur d'un rôle des protéines SC35 et E2F1 dans le contrôle du statut prolifératif des tumeurs neuroendocrines de haut grade, via l'induction de la cycline E. Puisque nous avons montré « *in vitro* » que la voie dépendante d'AKT contrôle la phosphorylation de SC35 dans des modèles issus de tumeurs neuroendocrines ainsi que l'activité transcriptionnelle de E2F1 et SC35 au niveau du promoteur de la cycline E, on peut donc légitimement penser que l'hyperphosphorylation de SC35 observée dans les tumeurs bronchiques est en grande partie liée à l'activation d'AKT. Des expériences supplémentaires sont donc indispensables pour corroborer cette hypothèse, en particulier l'analyse par immunohistochimie du niveau d'expression et d'activation (phosphorylation) d'AKT dans les tumeurs pulmonaires et l'étude de la corrélation entre la phosphorylation de SC35 et le statut d'AKT dans ces tumeurs. Ainsi, conformément au modèle proposé par Hallstrom dans les tumeurs mammaires et ovariennes (Hallstrom *et al*, 2008), la voie AKT pourrait stimuler les fonctions prolifératives des protéines SC35 et E2F1 et prévenir leur fonction apoptotique dans les tumeurs pulmonaires neuroendocrines de haut grade.

## A

- Akusjarvi, G. and Stevenin, J. (2003) Remodelling of the host cell RNA splicing machinery during an adenovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, **272**, 253-286.
- Allemand, E., Batsche, E. and Muchardt, C. (2008) Splicing, transcription, and chromatin: a menage a trois. *Curr Opin Genet Dev*, **18**, 145-151.
- Alonso, M.M., Fueyo, J., Shay, J.W., Aldape, K.D., Jiang, H., Lee, O.H., Johnson, D.G., Xu, J., Kondo, Y., Kanzawa, T., Kyo, S., Bekele, B.N., Zhou, X., Nigro, J., McDonald, J.M., Yung, W.K. and Gomez-Manzano, C. (2005) Expression of transcription factor E2F1 and telomerase in glioblastomas: mechanistic linkage and prognostic significance. *J Natl Cancer Inst*, **97**, 1589-1600.
- Amrein, H., Gorman, M. and Nothiger, R. (1988) The sex-determining gene tra-2 of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell*, **55**, 1025-1035.
- Amrein, H., Hedley, M.L. and Maniatis, T. (1994) The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by Transformer 2. *Cell*, **76**, 735-746.
- Asano, M., Nevins, J.R. and Wharton, R.P. (1996) Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev*, **10**, 1422-1432.
- Ashraf, N., Zino, S., Macintyre, A., Kingsmore, D., Payne, A.P., George, W.D. and Shiels, P.G. (2006) Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. *Br J Cancer*, **95**, 1056-1061.
- Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E. and Helin, K. (2004) The E2F family: specific functions and overlapping interests. *Embo J*, **23**, 4709-4716.
- Auboeuf, D., Dowhan, D.H., Dutertre, M., Martin, N., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. (2005) A subset of nuclear receptor coregulators act as coupling proteins during synthesis and maturation of RNA transcripts. *Mol Cell Biol*, **25**, 5307-5316.
- Auboeuf, D., Dowhan, D.H., Kang, Y.K., Larkin, K., Lee, J.W., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. (2004a) Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes. *PNAS*, **101**, 2270-2274.
- Auboeuf, D., Dowhan, D.H., Li, X., Larkin, K., Ko, L., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. (2004b) CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing. *Mol Cell Biol*, **24**, 442-453.
- Auboeuf, D., Honig, A., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science*, **298**, 416-419.
- Ayane, M., Preuss, U., Kohler, G. and Nielsen, P.J. (1991) A differentially expressed murine RNA encoding a protein with similarities to two types of nucleic acid binding motifs. *Nucleic Acids Res*, **19**, 1273-1278.

**B**

Balciunaite, E., Spektor, A., Lents, N.H., Cam, H., Te Riele, H., Scime, A., Rudnicki, M.A., Young, R. and Dynlacht, B.D. (2005) Pocket protein complexes are recruited to distinct targets in quiescent and proliferating cells. *Mol Cell Biol*, **25**, 8166-8178.

Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., Seto, E. and Bhalla, K. (2005) Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem*, **280**, 26729-26734.

Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L. and Vousden, K.H. (1998) p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*, **395**, 124-125.

Batsche, E., Yaniv, M. and Muchardt, C. (2006) The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 22-29.

Bedard, K.M., Daijogo, S. and Semler, B.L. (2007) A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *Embo J*, **26**, 459-467.

Bell, L.A. and Ryan, K.M. (2004) Life and death decisions by E2F-1. *Cell Death Differ*, **11**, 137-142.

Berton, T.R., Mitchell, D.L., Guo, R. and Johnson, D.G. (2005) Regulation of epidermal apoptosis and DNA repair by E2F1 in response to ultraviolet B radiation. *Oncogene*, **24**, 2449-2460.

Bertos, N.R., Gilquin, B., Chan, G.K., Yen, T.J., Khochbin, S. and Yang, X.J. (2004) Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem*, **279**, 48246-48254.

Beyer, A.L. and Osheim, Y.N. (1988) Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes Dev*, **2**, 754-765.

Bi, B., Littlewood, N.K. and Crispe, I.N. (2001) Cleavage of E2F-1-regulating proteins and activation of E2F-1 during CD95-induced death of thymocytes. *Immunology*, **104**, 37-42.

Black, A.R. and Azizkhan-Clifford, J. (1999) Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene*, **237**, 281-302.

Black, D.L. (2000) Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell*, **103**, 367-370.

Black, D.L. (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, **72**, 291-336.

Blattner, C., Sparks, A. and Lane, D. (1999) Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol*, **19**, 3704-3713.

Blaustein, M., Pelisch, F., Tanos, T., Munoz, M.J., Wengier, D., Quadrana, L., Sanford, J.R., Muschietti, J.P., Kornblihtt, A.R., Caceres, J.F., Coso, O.A. and Srebrow, A. (2005) Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 1037-1044.



Blencowe, B.J. (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci*, **25**, 106-110.

Blencowe, B.J. (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell*, **126**, 37-47.

Blencowe, B.J., Bowman, J.A., McCracken, S. and Rosonina, E. (1999) SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors. *Biochem Cell Biol*, **77**, 277-291.

Boffa, L.C., Vidali, G., Mann, R.S. and Allfrey, V.G. (1978) Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem*, **253**, 3364-3366.

Bolden, J.E., Peart, M.J. and Johnstone, R.W. (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 769-784.

Borrow, J., Stanton, V.P., Jr., Andresen, J.M., Becher, R., Behm, F.G., Chaganti, R.S., Civin, C.I., Distche, C., Dube, I., Frischauf, A.M., Horsman, D., Mitelman, F., Volinia, S., Watmore, A.E. and Housman, D.E. (1996) The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet*, **14**, 33-41.

Boucher, L., Ouzounis, C.A., Enright, A.J. and Blencowe, B.J. (2001) A genome-wide survey of RS domain proteins. *Rna*, **7**, 1693-1701.

Boyault, C., Gilquin, B., Zhang, Y., Rybin, V., Garman, E., Meyer-Klaucke, W., Matthias, P., Muller, C.W. and Khochbin, S. (2006) HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *Embo J*, **25**, 3357-3366.

Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M. and Khochbin, S. (2007a) HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*, **26**, 5468-5476.

Boyault, C., Zhang, Y., Fritah, S., Caron, C., Gilquin, B., Kwon, S.H., Garrido, C., Yao, T.P., Vourc'h, C., Matthias, P. and Khochbin, S. (2007b) HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev*, **21**, 2172-2181.

Bradbury, C.A., Khanim, F.L., Hayden, R., Bunce, C.M., White, D.A., Drayson, M.T., Craddock, C. and Turner, B.M. (2005) Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*, **19**, 1751-1759.

Bramis, J., Zacharatos, P., Papaconstantinou, I., Kotsinas, A., Sigala, F., Korkolis, D.P., Nikiteas, N., Pazaiti, A., Kittas, C., Bastounis, E. and Gorgoulis, V.G. (2004) E2F-1 transcription factor immunoexpression is inversely associated with tumor growth in colon adenocarcinomas. *Anticancer Res*, **24**, 3041-3047.

Brichta, L., Hofmann, Y., Hahnen, E., Siebzehrubl, F.A., Raschke, H., Blumcke, I., Eyupoglu, I.Y. and Wirth, B. (2003) Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **12**, 2481-2489.

Brown, J.M., Green, J., das Neves, R.P., Wallace, H.A., Smith, A.J., Hughes, J., Gray, N., Taylor, S., Wood, W.G., Higgs, D.R., Iborra, F.J. and Buckle, V.J. (2008) Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *J Cell Biol*, **182**, 1083-1097.

Brown, M.T. and Cooper, J.A. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*, **1287**, 121-149.

Bruzik, J.P. and Maniatis, T. (1995) Enhancer-dependent interaction between 5' and 3' splice sites in trans. *PNAS*, **92**, 7056-7059.

Buratti, E., Stuani, C., De Prato, G. and Baralle, F.E. (2007) SR protein-mediated inhibition of CFTR exon 9 inclusion: molecular characterization of the intronic splicing silencer. *Nucleic Acids Res*, **35**, 4359-4368.

## C

Caceres, J.F., Misteli, T., Sreaton, G.R., Spector, D.L. and Krainer, A.R. (1997) Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol*, **138**, 225-238.

Caceres, J.F., Sreaton, G.R. and Krainer, A.R. (1998) A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev*, **12**, 55-66.

Caceres, J.F., Stamm, S., Helfman, D.M. and Krainer, A.R. (1994) Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science*, **265**, 1706-1709.

Campanero, M.R. and Flemington, E.K. (1997) Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein. *PNAS*, **94**, 2221-2226.

Cao, Q., Xia, Y., Azadniv, M. and Crispe, I.N. (2004) The E2F-1 transcription factor promotes caspase-8 and bid expression, and enhances Fas signaling in T cells. *J Immunol*, **173**, 1111-1117.

Cao, W., Jamison, S.F. and Garcia-Blanco, M.A. (1997) Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *Rna*, **3**, 1456-1467.

Cardoso, R.S., Espanhol, A.R., Passos, G.A. and Sakamoto-Hojo, E.T. (2002) Differential gene expression in gamma-irradiated BALB/3T3 fibroblasts under the influence of 3-aminobenzamide, an inhibitor of parp enzyme. *Mutat Res*, **508**, 33-40.

Caron, C., Boyault, C. and Khochbin, S. (2005) Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioessays*, **27**, 408-415.

Carter, K.C., Bowman, D., Carrington, W., Fogarty, K., McNeil, J.A., Fay, F.S. and Lawrence, J.B. (1993) A three-dimensional view of precursor messenger RNA metabolism within the mammalian nucleus. *Science*, **259**, 1330-1335.

Cavaloc, Y., Bourgeois, C.F., Kister, L. and Stevenin, J. (1999) The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers. *Rna*, **5**, 468-483.

Cavaloc, Y., Popielarz, M., Fuchs, J.P., Gattoni, R. and Stevenin, J. (1994) Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: a novel 35 kDa factor of the serine/arginine protein family. *Embo J*, **13**, 2639-2649.

- Cazalla, D., Zhu, J., Manche, L., Huber, E., Krainer, A.R. and Caceres, J.F. (2002) Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins. *Mol Cell Biol*, **22**, 6871-6882.
- Ceol, C.J. and Horvitz, H.R. (2001) dpl-1 DP and efl-1 E2F act with lin-35 Rb to antagonize Ras signaling in *C. elegans* vulval development. *Mol Cell*, **7**, 461-473.
- Chalfant, C.E., Ogretmen, B., Galadari, S., Kroesen, B.J., Pettus, B.J. and Hannun, Y.A. (2001) FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1. *J Biol Chem*, **276**, 44848-44855.
- Chalfant, C.E., Rathman, K., Pinkerman, R.L., Wood, R.E., Obeid, L.M., Ogretmen, B. and Hannun, Y.A. (2002) De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, **277**, 12587-12595.
- Champagne, N., Bertos, N.R., Pelletier, N., Wang, A.H., Vezmar, M., Yang, Y., Heng, H.H. and Yang, X.J. (1999) Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem*, **274**, 28528-28536.
- Chan, H.M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Demonacos, C. and La Thangue, N.B. (2001) Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol*, **3**, 667-674.
- Chandler, S.D., Mayeda, A., Yeakley, J.M., Krainer, A.R. and Fu, X.D. (1997) RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins. *PNAS*, **94**, 3596-3601.
- Chandradas, S., Deikus, G., Tardos, J.G. and Bogdanov, V.Y. (2010) Antagonistic roles of four SR proteins in the biosynthesis of alternatively spliced tissue factor transcripts in monocytic cells. *J Leukoc Biol*, **87**, 147-152.
- Chang, J.G., Hsieh-Li, H.M., Jong, Y.J., Wang, N.M., Tsai, C.H. and Li, H. (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *PNAS*, **98**, 9808-9813.
- Chaudhary, N., McMahon, C. and Blobel, G. (1991) Primary structure of a human arginine-rich nuclear protein that colocalizes with spliceosome components. *PNAS*, **88**, 8189-8193.
- Chaussepied, M. and Ginsberg, D. (2004) Transcriptional regulation of AKT activation by E2F. *Mol Cell*, **16**, 831-837.
- Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M. and Nevins, J.R. (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, **65**, 1053-1061.
- Chiara, M.D. and Reed, R. (1995) A two-step mechanism for 5' and 3' splice-site pairing. *Nature*, **375**, 510-513.
- Choi, Y.D. and Dreyfuss, G. (1984) Isolation of the heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein complex (hnRNP): a unique supramolecular assembly. *PNAS*, **81**, 7471-7475.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V. and Mann, M. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, **325**, 834-840.

Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., Klinkenberg, D., Bracken, A.P., Trinh, E., Heeran, M., Di Stefano, L. and Helin, K. (2005) Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res*, **33**, 5458-5470.

Col, E., Caron, C., Chable-Bessia, C., Legube, G., Gazzeri, S., Komatsu, Y., Yoshida, M., Benkirane, M., Trouche, D. and Khochbin, S. (2005) HIV-1 Tat targets Tip60 to impair the apoptotic cell response to genotoxic stresses. *Embo J*, **24**, 2634-2645.

Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J.L., Bell, J.C. and Duncan, P.I. (1996) The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *Embo J*, **15**, 265-275.

Conner, E.A., Lemmer, E.R., Omori, M., Wirth, P.J., Factor, V.M. and Thorgeirsson, S.S. (2000) Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis. *Oncogene*, **19**, 5054-5062.

## D

Dangond, F. and Gullans, S.R. (1998) Differential expression of human histone deacetylase mRNAs in response to immune cell apoptosis induction by trichostatin A and butyrate. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 833-837.

Das, R., Yu, J., Zhang, Z., Gygi, M.P., Krainer, A.R., Gygi, S.P. and Reed, R. (2007) SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, **26**, 867-881.

Dauksaite, V. and Akusjarvi, G. (2004) The second RNA-binding domain of the human splicing factor ASF/SF2 is the critical domain controlling adenovirus E1A alternative 5'-splice site selection. *Biochem J*, **381**, 343-350.

Davie, J.R. (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr*, **133**, 2485S-2493S.

de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R. and Leone, G. (2003) Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem*, **278**, 42041-42049.

de la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D. and Kornblihtt, A.R. (2003) A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol Cell*, **12**, 525-532.

de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S. and van Kuilenburg, A.B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, **370**, 737-749.

de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J. and Lowe, S.W. (1998) E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev*, **12**, 2434-2442.

DeGregori, J. (2002) The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta*, **1602**, 131-150.

DeGregori, J. and Johnson, D.G. (2006) Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med*, **6**, 739-748.

- DeGregori, J., Leone, G., Ohtani, K., Miron, A. and Nevins, J.R. (1995a) E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev*, **9**, 2873-2887.
- DeGregori, J., Kowalik, T. and Nevins, J.R. (1995b) Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol*, **15**, 4215-4224.
- DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L. and Nevins, J.R. (1997) Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *PNAS*, **94**, 7245-7250.
- Deroanne, C.F., Bonjean, K., Servotte, S., Devy, L., Colige, A., Clause, N., Blacher, S., Verdin, E., Foidart, J.M., Nusgens, B.V. and Castronovo, V. (2002) Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene*, **21**, 427-436.
- Deutsch, M. and Long, M. (1999) Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Res*, **27**, 3219-3228.
- Dhordain, P., Lin, R.J., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J.P., Evans, R.M. and Albagli, O. (1998) The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4645-4651.
- Di Gennaro, E., Bruzzese, F., Caraglia, M., Abruzzese, A. and Budillon, A. (2004) Acetylation of proteins as novel target for antitumor therapy: review article. *Amino Acids*, **26**, 435-441.
- Di Stefano, L., Jensen, M.R. and Helin, K. (2003) E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *Embo J*, **22**, 6289-6298.
- Dick, F.A. and Dyson, N. (2003) pRB contains an E2F1-specific binding domain that allows E2F1-induced apoptosis to be regulated separately from other E2F activities. *Mol Cell*, **12**, 639-649.
- Dicker, A.J., Popa, C., Dahler, A.L., Serewko, M.M., Hilditch-Maguire, P.A., Frazer, I.H. and Saunders, N.A. (2000) E2F-1 induces proliferation-specific genes and suppresses squamous differentiation-specific genes in human epidermal keratinocytes. *Oncogene*, **19**, 2887-2894.
- Dimova, D.K. and Dyson, N.J. (2005) The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*, **24**, 2810-2826.
- Dimova, D.K., Stevaux, O., Frolov, M.V. and Dyson, N.J. (2003) Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the Drosophila E2F/RB pathway. *Genes Dev*, **17**, 2308-2320.
- Dimri, G.P., Itahana, K., Acosta, M. and Campisi, J. (2000) Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol*, **20**, 273-285.
- Ding, J.H., Xu, X., Yang, D., Chu, P.H., Dalton, N.D., Ye, Z., Yeakley, J.M., Cheng, H., Xiao, R.P., Ross, J., Chen, J. and Fu, X.D. (2004) Dilated cardiomyopathy caused by tissue-specific ablation of SC35 in the heart. *Embo J*, **23**, 885-896.
- Ding, J.H., Zhong, X.Y., Hagopian, J.C., Cruz, M.M., Ghosh, G., Feramisco, J., Adams, J.A. and Fu, X.D. (2006) Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **17**, 876-885.

Dino Rockel, T. and von Mikecz, A. (2002) Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization. *J Struct Biol*, **140**, 189-199.

Dong, Y.B., Yang, H.L., Elliott, M.J. and McMasters, K.M. (2002) Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer sensitizes melanoma cells to apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res*, **62**, 1776-1783.

Dowhan, D.H., Hong, E.P., Auboeuf, D., Dennis, A.P., Wilson, M.M., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. (2005) Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta. *Mol Cell*, **17**, 429-439.

Du, C., McGuffin, M.E., Dauwalder, B., Rabinow, L. and Mattox, W. (1998) Protein phosphorylation plays an essential role in the regulation of alternative splicing and sex determination in *Drosophila*. *Mol Cell*, **2**, 741-750.

Du, W., Xie, J.E. and Dyson, N. (1996) Ectopic expression of dE2F and dDP induces cell proliferation and death in the *Drosophila* eye. *Embo J*, **15**, 3684-3692.

Duncan, P.I., Stojdl, D.F., Marius, R.M., Scheit, K.H. and Bell, J.C. (1998) The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res*, **241**, 300-308.

Dynlacht, B.D., Brook, A., Dembski, M., Yenush, L. and Dyson, N. (1994) DNA-binding and trans-activation properties of *Drosophila* E2F and DP proteins. *PNAS*, **91**, 6359-6363.

## E

Ebihara, Y., Miyamoto, M., Shichinohe, T., Kawarada, Y., Cho, Y., Fukunaga, A., Murakami, S., Uehara, H., Kaneko, H., Hashimoto, H., Murakami, Y., Itoh, T., Okushiba, S., Kondo, S. and Katoh, H. (2004) Over-expression of E2F-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with tumor progression. *Dis Esophagus*, **17**, 150-154.

Eldridge, A.G., Li, Y., Sharp, P.A. and Blencowe, B.J. (1999) The SRm160/300 splicing coactivator is required for exon-enhancer function. *PNAS*, **96**, 6125-6130.

Elliott, M.J., Farmer, M.R., Atienza, C., Jr., Stilwell, A., Dong, Y.B., Yang, H.L., Wong, S.L. and McMasters, K.M. (2002) E2F-1 gene therapy induces apoptosis and increases chemosensitivity in human pancreatic carcinoma cells. *Tumour Biol*, **23**, 76-86.

Eymin, B., Claverie, P., Salon, C., Leduc, C., Col, E., Brambilla, E., Khochbin, S. and Gazzeri, S. (2006) p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol*, **26**, 4339-4350.

Eymin, B., Gazzeri, S., Brambilla, C. and Brambilla, E. (2001) Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene*, **20**, 1678-1687.

**F**

- Fagan, R., Flint, K.J. and Jones, N. (1994) Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein. *Cell*, **78**, 799-811.
- Fairbrother, W.G. and Chasin, L.A. (2000) Human genomic sequences that inhibit splicing. *Mol Cell Biol*, **20**, 6816-6825.
- Faustino, N.A. and Cooper, T.A. (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*, **17**, 419-437.
- Feng, Y., Chen, M. and Manley, J.L. (2008) Phosphorylation switches the general splicing repressor SRp38 to a sequence-specific activator. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 1040-1048.
- Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T., Nygard, K., Lin, R., Cormier, O., Lee, H.S., Eng, F., Bertos, N.R., Pelletier, N., Mader, S., Han, V.K., Yang, X.J. and White, J.H. (2003) Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell*, **11**, 139-150.
- Ferreira, R., Naguibneva, I., Pritchard, L.L., Ait-Si-Ali, S. and Harel-Bellan, A. (2001) The Rb/chromatin connection and epigenetic control: opinion. *Oncogene*, **20**, 3128-3133.
- Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.G., Jr., Livingston, D.M., Orkin, S.H. and Greenberg, M.E. (1996) E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell*, **85**, 549-561.
- Filippov, V., Filippova, M. and Duerksen-Hughes, P.J. (2007) The early response to DNA damage can lead to activation of alternative splicing activity resulting in CD44 splice pattern changes. *Cancer Res*, **67**, 7621-7630.
- Fischer, D.C., Noack, K., Runnebaum, I.B., Watermann, D.O., Kieback, D.G., Stamm, S. and Stickeler, E. (2004) Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncol Rep*, **11**, 1085-1090.
- Fong, Y.W. and Zhou, Q. (2001) Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature*, **414**, 929-933.
- Frolov, M.V., Huen, D.S., Stevaux, O., Dimova, D., Balczarek-Strang, K., Elsdon, M. and Dyson, N.J. (2001) Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev*, **15**, 2146-2160.
- Fu, X.D. and Maniatis, T. (1990) Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature*, **343**, 437-441.
- Fu, X.D. and Maniatis, T. (1992a) Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science*, **256**, 535-538.
- Fu, X.D. and Maniatis, T. (1992b) The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site. *PNAS*, **89**, 1725-1729.

Furukawa, Y., Nishimura, N., Furukawa, Y., Satoh, M., Endo, H., Iwase, S., Yamada, H., Matsuda, M., Kano, Y. and Nakamura, M. (2002) Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 39760-39768.

## G

Gabut, M., Dejardin, J., Tazi, J. and Soret, J. (2007) The SR family proteins B52 and dASF/SF2 modulate development of the Drosophila visual system by regulating specific RNA targets. *Mol Cell Biol*, **27**, 3087-3097.

Galbiati, L., Mendoza-Maldonado, R., Gutierrez, M.I. and Giacca, M. (2005) Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle*, **4**, 930-939.

Gallego, M.E., Gattoni, R., Stevenin, J., Marie, J. and Expert-Bezancon, A. (1997) The SR splicing factors ASF/SF2 and SC35 have antagonistic effects on intronic enhancer-dependent splicing of the beta-tropomyosin alternative exon 6A. *Embo J*, **16**, 1772-1784.

Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F. and Atadja, P. (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem*, **277**, 25748-25755.

Gao, Y.S., Hubbert, C.C., Lu, J., Lee, Y.S., Lee, J.Y. and Yao, T.P. (2007) Histone deacetylase 6 regulates growth factor-induced actin remodeling and endocytosis. *Mol Cell Biol*, **27**, 8637-8647.

Gaughan, L., Brady, M.E., Cook, S., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2001) Tip60 is a co-activator specific for class I nuclear hormone receptors. *J Biol Chem*, **276**, 46841-46848.

Gaughan, L., Logan, I.R., Cook, S., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2002) Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem*, **277**, 25904-25913.

Gayther, S.A., Batley, S.J., Linger, L., Bannister, A., Thorpe, K., Chin, S.F., Daigo, Y., Russell, P., Wilson, A., Sowter, H.M., Delhanty, J.D., Ponder, B.A., Kouzarides, T. and Caldas, C. (2000) Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet*, **24**, 300-303.

Ge, H., Si, Y. and Wolffe, A.P. (1998) A novel transcriptional coactivator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2. *Mol Cell*, **2**, 751-759.

Ge, H., Zuo, P. and Manley, J.L. (1991) Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with Drosophila regulators. *Cell*, **66**, 373-382.

Ge, X., Jin, Q., Zhang, F., Yan, T. and Zhai, Q. (2009) PCAF acetylates {beta}-catenin and improves its stability. *Mol Biol Cell*, **20**, 419-427.

Gehring, N.H., Kunz, J.B., Neu-Yilik, G., Breit, S., Viegas, M.H., Hentze, M.W. and Kulozik, A.E. (2005) Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol Cell*, **20**, 65-75.

Ghigna, C., Giordano, S., Shen, H., Benvenuto, F., Castiglioni, F., Comoglio, P.M., Green, M.R., Riva, S. and Biamonti, G. (2005) Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Mol Cell*, **20**, 881-890.



- Ghigna, C., Moroni, M., Porta, C., Riva, S. and Biamonti, G. (1998) Altered expression of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and SR factors in human colon adenocarcinomas. *Cancer Res*, **58**, 5818-5824.
- Gilbert, W. and Guthrie, C. (2004) The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Mol Cell*, **13**, 201-212.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D. and Hay, R.T. (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell*, **11**, 1043-1054.
- Glaser, K.B., Staver, M.J., Waring, J.F., Stender, J., Ulrich, R.G. and Davidsen, S.K. (2003) Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther*, **2**, 151-163.
- Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X. and Seto, E. (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, **363**, 15-23.
- Gobert, C., Bracco, L., Rossi, F., Olivier, M., Tazi, J., Lavelle, F., Larsen, A.K. and Riou, J.F. (1996) Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53. *Biochemistry*, **35**, 5778-5786.
- Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Mariatos, G., Kotsinas, A., Bouda, M., Kletsas, D., Asimacopoulos, P.J., Agnantis, N., Kittas, C. and Papavassiliou, A.G. (2002) Transcription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol*, **198**, 142-156.
- Gorrini, C., Squatrito, M., Luise, C., Syed, N., Perna, D., Wark, L., Martinato, F., Sardella, D., Verrecchia, A., Bennett, S., Confalonieri, S., Cesaroni, M., Marchesi, F., Gasco, M., Scanziani, E., Capra, M., Mai, S., Nuciforo, P., Crook, T., Lough, J. and Amati, B. (2007) Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature*, **448**, 1063-1067.
- Graveley, B.R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna*, **6**, 1197-1211.
- Graveley, B.R., Hertel, K.J. and Maniatis, T. (1998) A systematic analysis of the factors that determine the strength of pre-mRNA splicing enhancers. *Embo J*, **17**, 6747-6756.
- Graveley, B.R. and Maniatis, T. (1998) Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, **1**, 765-771.
- Gross, T., Richert, K., Mierke, C., Lutzelberger, M. and Kaufer, N.F. (1998) Identification and characterization of *srp1*, a gene of fission yeast encoding a RNA binding domain and a RS domain typical of SR splicing factors. *Nucleic Acids Res*, **26**, 505-511.
- Grossman, S.R., Deato, M.E., Brignone, C., Chan, H.M., Kung, A.L., Tagami, H., Nakatani, Y. and Livingston, D.M. (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science*, **300**, 342-344.
- Grosso, A.R., Martins, S. and Carmo-Fonseca, M. (2008) The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO Rep*, **9**, 1087-1093.

Grozinger, C.M., Chao, E.D., Blackwell, H.E., Moazed, D. and Schreiber, S.L. (2001) Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J Biol Chem*, **276**, 38837-38843.

Grozinger, C.M., Hassig, C.A. and Schreiber, S.L. (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *PNAS*, **96**, 4868-4873.

Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**, 595-606.

Gui, J.F., Lane, W.S. and Fu, X.D. (1994) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*, **369**, 678-682.

Guillouf, C., Gallais, I. and Moreau-Gachelin, F. (2006) Spi-1/PU.1 oncoprotein affects splicing decisions in a promoter binding-dependent manner. *J Biol Chem*, **281**, 19145-19155.

Gunderson, F.Q. and Johnson, T.L. (2009) Acetylation by the transcriptional coactivator Gcn5 plays a novel role in co-transcriptional spliceosome assembly. *PLoS Genet*, **5**, e1000682.

## H

Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M. and Schreiber, S.L. (2003) Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *PNAS*, **100**, 4389-4394.

Hagopian, J.C., Ma, C.T., Meade, B.R., Albuquerque, C.P., Ngo, J.C., Ghosh, G., Jennings, P.A., Fu, X.D. and Adams, J.A. (2008) Adaptable molecular interactions guide phosphorylation of the SR protein ASF/SF2 by SRPK1. *J Mol Biol*, **382**, 894-909.

Hall, L.L., Smith, K.P., Byron, M. and Lawrence, J.B. (2006) Molecular anatomy of a speckle. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, **288**, 664-675.

Hallier, M., Lerga, A., Barnache, S., Tavitian, A. and Moreau-Gachelin, F. (1998) The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem*, **273**, 4838-4842.

Hallstrom, T.C., Mori, S. and Nevins, J.R. (2008) An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death. *Cancer Cell*, **13**, 11-22.

Hallstrom, T.C. and Nevins, J.R. (2003) Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *PNAS*, **100**, 10848-10853.

Hamelberg, D., Shen, T. and McCammon, J.A. (2007) A proposed signaling motif for nuclear import in mRNA processing via the formation of arginine claw. *PNAS*, **104**, 14947-14951.

Harbour, J.W. and Dean, D.C. (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, **14**, 2393-2409.

Hartmann, A.M., Rujescu, D., Giannakouros, T., Nikolakaki, E., Goedert, M., Mandelkow, E.M., Gao, Q.S., Andreadis, A. and Stamm, S. (2001) Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors. *Mol Cell Neurosci*, **18**, 80-90.

Hartmuth, K., Urlaub, H., Vornlocher, H.P., Will, C.L., Gentzel, M., Wilm, M. and Luhrmann, R. (2002) Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *PNAS*, **99**, 16719-16724.

Hauck, L., Kaba, R.G., Lipp, M., Dietz, R. and von Harsdorf, R. (2002) Regulation of E2F1-dependent gene transcription and apoptosis by the ETS-related transcription factor GABPgamma1. *Mol Cell Biol*, **22**, 2147-2158.

Hayes, G.M., Carrigan, P.E. and Miller, L.J. (2007) Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer Res*, **67**, 2072-2080.

He, Y., Armanious, M.K., Thomas, M.J. and Cress, W.D. (2000a) Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region. *Oncogene*, **19**, 3422-3433.

He, S., Cook, B.L., Deverman, B.E., Weihe, U., Zhang, F., Prachand, V., Zheng, J. and Weintraub, S.J. (2000b) E2F is required to prevent inappropriate S-phase entry of mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 363-371.

He, X., Ee, P.L., Coon, J.S. and Beck, W.T. (2004) Alternative splicing of the multidrug resistance protein 1/ATP binding cassette transporter subfamily gene in ovarian cancer creates functional splice variants and is associated with increased expression of the splicing factors PTB and SRp20. *Clin Cancer Res*, **10**, 4652-4660.

Hedley, M.L., Amrein, H. and Maniatis, T. (1995) An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor. *PNAS*, **92**, 11524-11528.

Helin, K. (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 28-35.

Helin, K., Harlow, E. and Fattaey, A. (1993) Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **13**, 6501-6508.

Helin, K., Lees, J.A., Vidal, M., Dyson, N., Harlow, E. and Fattaey, A. (1992) A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell*, **70**, 337-350.

Hernandez, F., Perez, M., Lucas, J.J., Mata, A.M., Bhat, R. and Avila, J. (2004) Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, **279**, 3801-3806.

Hershko, T. and Ginsberg, D. (2004) Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 8627-8634.

Hertel, K.J. and Maniatis, T. (1999) Serine-arginine (SR)-rich splicing factors have an exon-independent function in pre-mRNA splicing. *PNAS*, **96**, 2651-2655.

Hiratsuka, M., Inoue, T., Toda, T., Kimura, N., Shirayoshi, Y., Kamitani, H., Watanabe, T., Ohama, E., Tahimic, C.G., Kurimasa, A. and Oshimura, M. (2003) Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **309**, 558-566.

Hirose, Y. and Ohkuma, Y. (2007) Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J Biochem*, **141**, 601-608.

Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, **30**, 405-439.

Hook, S.S., Orian, A., Cowley, S.M. and Eisenman, R.N. (2002) Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *PNAS*, **99**, 13425-13430.

Hoshikawa, Y., Kwon, H.J., Yoshida, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1994) Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines. *Exp Cell Res*, **214**, 189-197.

Hrzenjak, A., Moinfar, F., Kremser, M.L., Strohmeier, B., Staber, P.B., Zatloukal, K. and Denk, H. (2006) Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Ther*, **5**, 2203-2210.

Huang, B.H., Laban, M., Leung, C.H., Lee, L., Lee, C.K., Salto-Tellez, M., Raju, G.C. and Hooi, S.C. (2005) Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ*, **12**, 395-404.

Huang, S. and Spector, D.L. (1991) Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors. *Genes Dev*, **5**, 2288-2302.

Huang, Y., Gattoni, R., Stevenin, J. and Steitz, J.A. (2003) SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol Cell*, **11**, 837-843.

Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kato, T. and Yuan, Z.M. (1997) Role for E2F in DNA damage-induced entry of cells into S phase. *Cancer Res*, **57**, 3640-3643.

Huang, Y. and Steitz, J.A. (2001) Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell*, **7**, 899-905.

Huang, Y., Yario, T.A. and Steitz, J.A. (2004) A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *PNAS*, **101**, 9666-9670.

Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F. and Yao, T.P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, **417**, 455-458.

Huffman, D.M., Grizzle, W.E., Bamman, M.M., Kim, J.S., Eltoum, I.A., Elgavish, A. and Nagy, T.R. (2007) SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res*, **67**, 6612-6618.

Hui, L., Zhang, X., Wu, X., Lin, Z., Wang, Q., Li, Y. and Hu, G. (2004) Identification of alternatively spliced mRNA variants related to cancers by genome-wide ESTs alignment. *Oncogene*, **23**, 3013-3023.

## I

Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E. and Gulino, A. (2004) Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J Biol Chem*, **279**, 30830-30835.

Iaquinta, P.J. and Lees, J.A. (2007) Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 649-657.

Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H. and Kaelin, W.G., Jr. (2000) Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature*, **407**, 645-648.

Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M. and Nevins, J.R. (2001) Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol*, **21**, 4684-4699.

Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C.H., Kovacs, J.J., Higashimoto, Y., Appella, E. and Yao, T.P. (2002) MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *Embo J*, **21**, 6236-6245.

Ito, Y., Ide, T. and Mitsui, Y. (1998) Expressional changes in alternative splicing affecting genes during cell passage of human diploid fibroblasts. *Mech Ageing Dev*, **105**, 105-114.

Iwabata, H., Yoshida, M. and Komatsu, Y. (2005) Proteomic analysis of organ-specific post-translational lysine-acetylation and -methylation in mice by use of anti-acetyllysine and -methyllysine mouse monoclonal antibodies. *Proteomics*, **5**, 4653-4664.

Iwanaga, R., Komori, H., Ishida, S., Okamura, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I. and Ohtani, K. (2006) Identification of novel E2F1 target genes regulated in cell cycle-dependent and independent manners. *Oncogene*, **25**, 1786-1798.

## J

Jackson, M.D., Schmidt, M.T., Oppenheimer, N.J. and Denu, J.M. (2003) Mechanism of nicotinamide inhibition and transglycosidation by Sir2 histone/protein deacetylases. *J Biol Chem*, **278**, 50985-50998.

Jang, S.W., Liu, X., Fu, H., Rees, H., Yepes, M., Levey, A. and Ye, K. (2009) Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons. *J Biol Chem*, **284**, 24512-24525.

Jang, S.W., Yang, S.J., Ehlen, A., Dong, S., Khoury, H., Chen, J., Persson, J.L. and Ye, K. (2008) Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1. *Cancer Res*, **68**, 4559-4570.

Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J. and Kim, K.W. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, **111**, 709-720.

Jiang, K., Patel, N.A., Watson, J.E., Apostolatos, H., Kleiman, E., Hanson, O., Hagiwara, M. and Cooper, D.R. (2009) Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Cik/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKCbetaII messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*, **150**, 2087-2097.

Jiang, S.X., Sheldrick, M., Desbois, A., Slinn, J. and Hou, S.T. (2007) Neuropilin-1 is a direct target of the transcription factor E2F1 during cerebral ischemia-induced neuronal death in vivo. *Mol Cell Biol*, **27**, 1696-1705.

Jiang, Z.H., Zhang, W.J., Rao, Y. and Wu, J.Y. (1998) Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *PNAS*, **95**, 9155-9160.

Jin, Y.H., Jeon, E.J., Li, Q.L., Lee, Y.H., Choi, J.K., Kim, W.J., Lee, K.Y. and Bae, S.C. (2004) Transforming growth factor-beta stimulates p300-dependent RUNX3 acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation. *J Biol Chem*, **279**, 29409-29417.

Johnson, D.G., Cress, W.D., Jakoi, L. and Nevins, J.R. (1994) Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *PNAS*, **91**, 12823-12827.

Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D. and Nevins, J.R. (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*, **365**, 349-352.

Johnson, J.M., Castle, J., Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P.M., Armour, C.D., Santos, R., Schadt, E.E., Stoughton, R. and Shoemaker, D.D. (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*, **302**, 2141-2144.

Jolly, C., Vourc'h, C., Robert-Nicoud, M. and Morimoto, R.I. (1999) Intron-independent association of splicing factors with active genes. *J Cell Biol*, **145**, 1133-1143.

Jordan-Sciutto, K.L., Wang, G., Murphy-Corb, M. and Wiley, C.A. (2000) Induction of cell-cycle regulators in simian immunodeficiency virus encephalitis. *Am J Pathol*, **157**, 497-507.

Jumaa, H., Guenet, J.L. and Nielsen, P.J. (1997) Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle. *Mol Cell Biol*, **17**, 3116-3124.

Jumaa, H. and Nielsen, P.J. (1997) The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *Embo J*, **16**, 5077-5085.

Jumaa, H., Wei, G. and Nielsen, P.J. (1999) Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20. *Curr Biol*, **9**, 899-902.

Jurica, M.S., Licklider, L.J., Gygi, S.R., Grigorieff, N. and Moore, M.J. (2002) Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *Rna*, **8**, 426-439.

Jurica, M.S. and Moore, M.J. (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell*, **12**, 5-14.

## K

Kadener, S., Fededa, J.P., Rosbash, M. and Kornblihtt, A.R. (2002) Regulation of alternative splicing by a transcriptional enhancer through RNA pol II elongation. *PNAS*, **99**, 8185-8190.

Kaelin, W.G., Jr., Krek, W., Sellers, W.R., DeCaprio, J.A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C.S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P.J., Blanar, M.A. and et al. (1992) Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell*, **70**, 351-364.

Kamachi, M., Le, T.M., Kim, S.J., Geiger, M.E., Anderson, P. and Utz, P.J. (2002) Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *J Exp Med*, **196**, 1213-1225.

- Kameoka, S., Duque, P. and Konarska, M.M. (2004) p54(nrb) associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes. *Embo J*, **23**, 1782-1791.
- Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D. and Chinnadurai, G. (1996) Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology*, **216**, 357-366.
- Kanopka, A., Muhlemann, O. and Akusjarvi, G. (1996) Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature*, **381**, 535-538.
- Kanopka, A., Muhlemann, O., Petersen-Mahrt, S., Estmer, C., Ohrmalm, C. and Akusjarvi, G. (1998) Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins. *Nature*, **393**, 185-187.
- Karakama, Y., Sakamoto, N., Itsui, Y., Nakagawa, M., Tasaka-Fujita, M., Nishimura-Sakurai, Y., Kakinuma, S., Oooka, M., Azuma, S., Tsuchiya, K., Onogi, H., Hagiwara, M. and Watanabe, M. (2010) Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob Agents Chemother*, ahead of print.
- Karlseder, J., Rotheneder, H. and Wintersberger, E. (1996) Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol*, **16**, 1659-1667.
- Karni, R., de Stanchina, E., Lowe, S.W., Sinha, R., Mu, D. and Krainer, A.R. (2007) The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 185-193.
- Karni, R., Hippo, Y., Lowe, S.W. and Krainer, A.R. (2008) The splicing-factor oncoprotein SF2/ASF activates mTORC1. *PNAS*, **105**, 15323-15327.
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A. and Yao, T.P. (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, **115**, 727-738.
- Kherrouche, Z., De Launoit, Y. and Monte, D. (2004) Human E2F6 is alternatively spliced to generate multiple protein isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, **317**, 749-760.
- Kim, E., Goren, A. and Ast, G. (2008) Insights into the connection between cancer and alternative splicing. *Trends Genet*, **24**, 7-10.
- Kim, S.C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N.V., White, M., Yang, X.J. and Zhao, Y. (2006a) Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell*, **23**, 607-618.
- Kim, H.R., Kim, E.J., Yang, S.H., Jeong, E.T., Park, C., Lee, J.H., Youn, M.J., So, H.S. and Park, R. (2006b) Trichostatin A induces apoptosis in lung cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway? *Exp Mol Med*, **38**, 616-624.
- Kim, M.S., Kwon, H.J., Lee, Y.M., Baek, J.H., Jang, J.E., Lee, S.W., Moon, E.J., Kim, H.S., Lee, S.K., Chung, H.Y., Kim, C.W. and Kim, K.W. (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med*, **7**, 437-443.

- Kim, Y.B., Lee, K.H., Sugita, K., Yoshida, M. and Horinouchi, S. (1999) Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. *Oncogene*, **18**, 2461-2470.
- Kohtz, J.D., Jamison, S.F., Will, C.L., Zuo, P., Luhrmann, R., Garcia-Blanco, M.A. and Manley, J.L. (1994) Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature*, **368**, 119-124.
- Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X.S. and Ahringer, J. (2009) Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat Genet*, **41**, 376-381.
- Kornblihtt, A.R. (2006) Chromatin, transcript elongation and alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 5-7.
- Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B. and Yao, T.P. (2005) HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell*, **18**, 601-607.
- Kovesdi, I., Reichel, R. and Nevins, J.R. (1986) Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell*, **45**, 219-228.
- Kowalik, T.F., DeGregori, J., Leone, G., Jakoi, L. and Nevins, J.R. (1998) E2F1-specific induction of apoptosis and p53 accumulation, which is blocked by Mdm2. *Cell Growth Differ*, **9**, 113-118.
- Koziczak, M., Krek, W. and Nagamine, Y. (2000) Pocket protein-independent repression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 gene expression by E2F1. *Mol Cell Biol*, **20**, 2014-2022.
- Krainer, A.R., Mayeda, A., Kozak, D. and Binns, G. (1991) Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and Drosophila splicing regulators. *Cell*, **66**, 383-394.
- Krek, W., Ewen, M.E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W.G., Jr. and Livingston, D.M. (1994) Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell*, **78**, 161-172.
- Krek, W., Xu, G. and Livingston, D.M. (1995) Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell*, **83**, 1149-1158.
- Kruhlak, M.J., Lever, M.A., Fischle, W., Verdin, E., Bazett-Jones, D.P. and Hendzel, M.J. (2000) Reduced mobility of the alternate splicing factor (ASF) through the nucleoplasm and steady state speckle compartments. *J Cell Biol*, **150**, 41-51.
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W.H., Swanson, S.K., Glaser, R.L., Yates, J.R., 3rd, Abmayr, S.M., Washburn, M.P. and Workman, J.L. (2004) Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science*, **306**, 2084-2087.
- Kwek, K.Y., Murphy, S., Furger, A., Thomas, B., O'Gorman, W., Kimura, H., Proudfoot, N.J. and Akoulitchev, A. (2002) U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation. *Nat Struct Biol*, **9**, 800-805.



**L**

La Thangue, N.B. and Rigby, P.W. (1987) An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells. *Cell*, **49**, 507-513.

Labourier, E., Rossi, F., Gallouzi, I.E., Allemand, E., Divita, G. and Tazi, J. (1998) Interaction between the N-terminal domain of human DNA topoisomerase I and the arginine-serine domain of its substrate determines phosphorylation of SF2/ASF splicing factor. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2955-2962.

Lai, M.C., Lin, R.I. and Tarn, W.Y. (2001) Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *PNAS*, **98**, 10154-10159.

Lai, M.C., Lin, R.I. and Tarn, W.Y. (2003) Differential effects of hyperphosphorylation on splicing factor SRp55. *Biochem J*, **371**, 937-945.

Lai, M.C. and Tarn, W.Y. (2004) Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *J Biol Chem*, **279**, 31745-31749.

Lai, M.C., Teh, B.H. and Tarn, W.Y. (1999) A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *J Biol Chem*, **274**, 11832-11841.

Lam, B.J. and Hertel, K.J. (2002) A general role for splicing enhancers in exon definition. *Rna*, **8**, 1233-1241.

Lamond, A.I. and Spector, D.L. (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 605-612.

Lang, S.E., McMahon, S.B., Cole, M.D. and Hearing, P. (2001) E2F transcriptional activation requires TRRAP and GCN5 cofactors. *J Biol Chem*, **276**, 32627-32634.

Lareau, L.F., Brooks, A.N., Soergel, D.A., Meng, Q. and Brenner, S.E. (2007) The coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay. *Adv Exp Med Biol*, **623**, 190-211.

Laski, F.A., Rio, D.C. and Rubin, G.M. (1986) Tissue specificity of Drosophila P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell*, **44**, 7-19.

Leduc, C., Claverie, P., Eymin, B., Col, E., Khochbin, S., Brambilla, E. and Gazzeri, S. (2006) p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene*, **25**, 4147-4154.

Lee, K., Du, C., Horn, M. and Rabinow, L. (1996) Activity and autophosphorylation of LAMMER protein kinases. *J Biol Chem*, **271**, 27299-27303.

Legube, G., Linares, L.K., Lemerrier, C., Scheffner, M., Khochbin, S. and Trouche, D. (2002) Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation. *Embo J*, **21**, 1704-1712.

- Lemaire, R., Prasad, J., Kashima, T., Gustafson, J., Manley, J.L. and Lafyatis, R. (2002) Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins. *Genes Dev*, **16**, 594-607.
- Leone, G., Nuckolls, F., Ishida, S., Adams, M., Sears, R., Jakoi, L., Miron, A. and Nevins, J.R. (2000) Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol Cell Biol*, **20**, 3626-3632.
- Li, X. and Manley, J.L. (2005) Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell*, **122**, 365-378.
- Li, X. and Manley, J.L. (2006) Alternative splicing and control of apoptotic DNA fragmentation. *Cell Cycle*, **5**, 1286-1288.
- Li, X., Wang, J. and Manley, J.L. (2005) Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes Dev*, **19**, 2705-2714.
- Li, Y., Zhang, X., Polakiewicz, R.D., Yao, T.P. and Comb, M.J. (2008) HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. *J Biol Chem*, **283**, 12686-12690.
- Lin, R.J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W.H., Jr. and Evans, R.M. (1998) Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature*, **391**, 811-814.
- Lin, S., Coutinho-Mansfield, G., Wang, D., Pandit, S. and Fu, X.D. (2008) The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 819-826.
- Lin, S., Xiao, R., Sun, P., Xu, X. and Fu, X.D. (2005) Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation. *Mol Cell*, **20**, 413-425.
- Lin, W.C., Lin, F.T. and Nevins, J.R. (2001) Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev*, **15**, 1833-1844.
- Linares, L.K., Kiernan, R., Triboulet, R., Chable-Bessia, C., Latreille, D., Cuvier, O., Lacroix, M., Le Cam, L., Coux, O. and Benkirane, M. (2007) Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat Cell Biol*, **9**, 331-338.
- Lindstrom, M.S. and Wiman, K.G. (2003) Myc and E2F1 induce p53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts. *Oncogene*, **22**, 4993-5005.
- Lissy, N.A., Davis, P.K., Irwin, M., Kaelin, W.G. and Dowdy, S.F. (2000) A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature*, **407**, 642-645.
- Liu, H.X., Cartegni, L., Zhang, M.Q. and Krainer, A.R. (2001) A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet*, **27**, 55-58.
- Liu, H.X., Chew, S.L., Cartegni, L., Zhang, M.Q. and Krainer, A.R. (2000) Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions. *Mol Cell Biol*, **20**, 1063-1071.
- Liu, H.X., Zhang, M. and Krainer, A.R. (1998) Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev*, **12**, 1998-2012.

Liu, K., Lin, F.T., Ruppert, J.M. and Lin, W.C. (2003a) Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1. *Mol Cell Biol*, **23**, 3287-3304.

Liu, L.T., Chang, H.C., Chiang, L.C. and Hung, W.C. (2003b) Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. *Cancer Res*, **63**, 3069-3072.

LLeonart, M.E., Vidal, F., Gallardo, D., Diaz-Fuertes, M., Rojo, F., Cuatrecasas, M., Lopez-Vicente, L., Kondoh, H., Blanco, C., Carnero, A. and Ramon y Cajal, S. (2006) New p53 related genes in human tumors: significant downregulation in colon and lung carcinomas. *Oncol Rep*, **16**, 603-608.

Logan, I.R., Sapountzi, V., Gaughan, L., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2004) Control of human PIRH2 protein stability: involvement of TIP60 and the proteasome. *J Biol Chem*, **279**, 11696-11704.

Logan, N., Graham, A., Zhao, X., Fisher, R., Maiti, B., Leone, G. and La Thangue, N.B. (2005) E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene*, **24**, 5000-5004.

Longman, D., Johnstone, I.L. and Caceres, J.F. (2000) Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Embo J*, **19**, 1625-1637.

Loomis, R.J., Naoe, Y., Parker, J.B., Savic, V., Bozovsky, M.R., Macfarlan, T., Manley, J.L. and Chakravarti, D. (2009) Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation. *Mol Cell*, **33**, 450-461.

Lopato, S., Kalyna, M., Dorner, S., Kobayashi, R., Krainer, A.R. and Barta, A. (1999) atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, regulates splicing of specific plant genes. *Genes Dev*, **13**, 987-1001.

Loughran, O. and La Thangue, N.B. (2000) Apoptotic and growth-promoting activity of E2F modulated by MDM2. *Mol Cell Biol*, **20**, 2186-2197.

Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M. and Misteli, T. (2010) Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science*, **327**, 996-1000.

Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J. and Helin, K. (1996) Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol*, **16**, 1047-1057.

## M

Ma, C.T., Hagopian, J.C., Ghosh, G., Fu, X.D. and Adams, J.A. (2009) Regiospecific phosphorylation control of the SR protein ASF/SF2 by SRPK1. *J Mol Biol*, **390**, 618-634.

Ma, Y., Chen, L., Wright, G.M., Pillai, S.R., Chellappan, S.P. and Cress, W.D. (2010) CDKN1C negatively regulates RNA polymerase II C-terminal domain phosphorylation in an E2F1-dependent manner. *J Biol Chem*, **285**, 9813-9822.

Ma, Y., Cress, W.D. and Haura, E.B. (2003) Flavopiridol-induced apoptosis is mediated through up-regulation of E2F1 and repression of Mcl-1. *Mol Cancer Ther*, **2**, 73-81.

- Maniatis, T. and Reed, R. (2002) An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*, **416**, 499-506.
- Mann, D.J. and Jones, N.C. (1996) E2F-1 but not E2F-4 can overcome p16-induced G1 cell-cycle arrest. *Curr Biol*, **6**, 474-483.
- Maris, C., Dominguez, C. and Allain, F.H. (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *Febs J*, **272**, 2118-2131.
- Markham, D., Munro, S., Soloway, J., O'Connor, D.P. and La Thangue, N.B. (2006) DNA-damage-responsive acetylation of pRb regulates binding to E2F-1. *EMBO Rep*, **7**, 192-198.
- Marks, P.A., Richon, V.M., Miller, T. and Kelly, W.K. (2004) Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res*, **91**, 137-168.
- Marks, P.A. and Xu, W.S. (2009) Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem*, **107**, 600-608.
- Martinez-Balbas, M.A., Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, A. and Kouzarides, T. (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J*, **19**, 662-671.
- Maser, R.S., Mirzoeva, O.K., Wells, J., Olivares, H., Williams, B.R., Zinkel, R.A., Farnham, P.J. and Petrini, J.H. (2001) Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol Cell Biol*, **21**, 6006-6016.
- Massiello, A. and Chalfant, C.E. (2006) SRp30a (ASF/SF2) regulates the alternative splicing of caspase-9 pre-mRNA and is required for ceramide-responsiveness. *J Lipid Res*, **47**, 892-897.
- Mathew, R., Hartmuth, K., Mohlmann, S., Urlaub, H., Ficner, R. and Luhrmann, R. (2008) Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 435-443.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S. and Yoshida, M. (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J*, **21**, 6820-6831.
- Mayeda, A. and Krainer, A.R. (1992) Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell*, **68**, 365-375.
- McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D. and Cole, M.D. (1998) The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell*, **94**, 363-374.
- Mermoud, J.E., Cohen, P.T. and Lamond, A.I. (1994) Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *Embo J*, **13**, 5679-5688.
- Michaud, S. and Reed, R. (1991) An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway. *Genes Dev*, **5**, 2534-2546.
- Michlewski, G., Sanford, J.R. and Caceres, J.F. (2008) The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell*, **30**, 179-189.

- Misteli, T., Caceres, J.F., Clement, J.Q., Krainer, A.R., Wilkinson, M.F. and Spector, D.L. (1998) Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *J Cell Biol*, **143**, 297-307.
- Misteli, T., Caceres, J.F. and Spector, D.L. (1997) The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*, **387**, 523-527.
- Misteli, T. and Spector, D.L. (1996) Serine/threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors. *Mol Biol Cell*, **7**, 1559-1572.
- Miyamoto, N., Izumi, H., Noguchi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Shiota, M., Kidani, A., Tawara, A. and Kohno, K. (2008) Tip60 is regulated by circadian transcription factor clock and is involved in cisplatin resistance. *J Biol Chem*, **283**, 18218-18226.
- Modrek, B. and Lee, C. (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet*, **30**, 13-19.
- Mole, S., Milligan, S.G. and Graham, S.V. (2009) Human papillomavirus type 16 E2 protein transcriptionally activates the promoter of a key cellular splicing factor, SF2/ASF. *J Virol*, **83**, 357-367.
- Molenaar, C., Abdulle, A., Gena, A., Tanke, H.J. and Dirks, R.W. (2004) Poly(A)+ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle domains in transcriptionally active and inactive cells. *J Cell Biol*, **165**, 191-202.
- Monsalve, M., Wu, Z., Adelmant, G., Puigserver, P., Fan, M. and Spiegelman, B.M. (2000) Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell*, **6**, 307-316.
- Moon, N.S., Frolov, M.V., Kwon, E.J., Di Stefano, L., Dimova, D.K., Morris, E.J., Taylor-Harding, B., White, K. and Dyson, N.J. (2005) Drosophila E2F1 has context-specific pro- and antiapoptotic properties during development. *Dev Cell*, **9**, 463-475.
- Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzerini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H. and Helin, K. (2001) Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol*, **3**, 552-558.
- Morris, L., Allen, K.E. and La Thangue, N.B. (2000) Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat Cell Biol*, **2**, 232-239.
- Mortillaro, M.J., Blencowe, B.J., Wei, X., Nakayasu, H., Du, L., Warren, S.L., Sharp, P.A. and Berezney, R. (1996) A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *PNAS*, **93**, 8253-8257.
- Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D. and Helin, K. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 267-285.
- Muller, H., Moroni, M.C., Vigo, E., Petersen, B.O., Bartek, J. and Helin, K. (1997) Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol*, **17**, 5508-5520.
- Mundle, S.D. and Saberwal, G. (2003) Evolving intricacies and implications of E2F1 regulation. *Faseb J*, **17**, 569-574.

Munshi, N., Merika, M., Yie, J., Senger, K., Chen, G. and Thanos, D. (1998) Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol Cell*, **2**, 457-467.

Muraki, M., Ohkawara, B., Hosoya, T., Onogi, H., Koizumi, J., Koizumi, T., Sumi, K., Yomoda, J., Murray, M.V., Kimura, H., Furuichi, K., Shibuya, H., Krainer, A.R., Suzuki, M. and Hagiwara, M. (2004) Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J Biol Chem*, **279**, 24246-24254.

Murr, R., Loizou, J.I., Yang, Y.G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z.Q. and Herceg, Z. (2006) Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, **8**, 91-99.

## N

Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R.V., McCurrach, M.E., Jacobson, M.D., Narita, M., Zhang, M.Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D. and Lowe, S.W. (2002) Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol*, **4**, 859-864.

Nakamura, M., Saito, H., Ebinuma, H., Wakabayashi, K., Saito, Y., Takagi, T., Nakamoto, N. and Ishii, H. (2001) Reduction of telomerase activity in human liver cancer cells by a histone deacetylase inhibitor. *J Cell Physiol*, **187**, 392-401.

Nayler, O., Stamm, S. and Ullrich, A. (1997) Characterization and comparison of four serine- and arginine-rich (SR) protein kinases. *Biochem J*, **326 (Pt 3)**, 693-700.

Nelson, M.A., Reynolds, S.H., Rao, U.N., Goulet, A.C., Feng, Y., Beas, A., Honchak, B., Averill, J., Lowry, D.T., Senft, J.R., Jefferson, A.M., Johnson, R.C. and Sargent, L.M. (2006) Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma. *Cancer Biol Ther*, **5**, 407-412.

Neuman, E., Sellers, W.R., McNeil, J.A., Lawrence, J.B. and Kaelin, W.G., Jr. (1996) Structure and partial genomic sequence of the human E2F1 gene. *Gene*, **173**, 163-169.

Ngo, J.C., Chakrabarti, S., Ding, J.H., Velazquez-Dones, A., Nolen, B., Aubol, B.E., Adams, J.A., Fu, X.D. and Ghosh, G. (2005) Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. *Mol Cell*, **20**, 77-89.

Ngo, J.C., Giang, K., Chakrabarti, S., Ma, C.T., Huynh, N., Hagopian, J.C., Dorrestein, P.C., Fu, X.D., Adams, J.A. and Ghosh, G. (2008) A sliding docking interaction is essential for sequential and processive phosphorylation of an SR protein by SRPK1. *Mol Cell*, **29**, 563-576.

Ni, J.Z., Grate, L., Donohue, J.P., Preston, C., Nobida, N., O'Brien, G., Shiue, L., Clark, T.A., Blume, J.E. and Ares, M., Jr. (2007) Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes Dev*, **21**, 708-718.

Niida, H., Katsuno, Y., Sengoku, M., Shimada, M., Yukawa, M., Ikura, M., Ikura, T., Kohno, K., Shima, H., Suzuki, H., Tashiro, S. and Nakanishi, M. (2010) Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes Dev*, **24**, 333-338.

Nissim-Rafinia, M., Aviram, M., Randell, S.H., Shushi, L., Ozeri, E., Chiba-Falek, O., Eidelman, O., Pollard, H.B., Yankaskas, J.R. and Kerem, B. (2004) Restoration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function by splicing modulation. *EMBO Rep*, **5**, 1071-1077.

Nogues, G., Kadener, S., Cramer, P., Bentley, D. and Kornblihtt, A.R. (2002) Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *J Biol Chem*, **277**, 43110-43114.

Novoyatleva, T., Heinrich, B., Tang, Y., Benderska, N., Butchbach, M.E., Lorson, C.L., Lorson, M.A., Ben-Dov, C., Fehlbaum, P., Bracco, L., Burghes, A.H., Bollen, M. and Stamm, S. (2008) Protein phosphatase 1 binds to the RNA recognition motif of several splicing factors and regulates alternative pre-mRNA processing. *Hum Mol Genet*, **17**, 52-70.

## O

Oberley, M.J., Inman, D.R. and Farnham, P.J. (2003) E2F6 negatively regulates BRCA1 in human cancer cells without methylation of histone H3 on lysine 9. *J Biol Chem*, **278**, 42466-42476.

O'Connor, D.J. and Lu, X. (2000) Stress signals induce transcriptionally inactive E2F-1 independently of p53 and Rb. *Oncogene*, **19**, 2369-2376.

Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M. and Nakatani, Y. (2002) A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*, **296**, 1132-1136.

Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**, 953-959.

Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D.R., Kelly, T.J. and Nevins, J.R. (1996) Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol Cell Biol*, **16**, 6977-6984.

Ohtani, K., Iwanaga, R., Nakamura, M., Ikeda, M., Yabuta, N., Tsuruga, H. and Nojima, H. (1999) Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene*, **18**, 2299-2309.

Ohtani, K. and Nevins, J.R. (1994) Functional properties of a Drosophila homolog of the E2F1 gene. *Mol Cell Biol*, **14**, 1603-1612.

Olaharski, A.J., Rine, J., Marshall, B.L., Babiarz, J., Zhang, L., Verdin, E. and Smith, M.T. (2005) The flavoring agent dihydrocoumarin reverses epigenetic silencing and inhibits sirtuin deacetylases. *PLoS Genet*, **1**, e77.

Ong, S.E., Mittler, G. and Mann, M. (2004) Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nat Methods*, **1**, 119-126.

## P

Pandey, U.B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B.A., Ritson, G.P., Nedelsky, N.B., Schwartz, S.L., DiProspero, N.A., Knight, M.A., Schuldiner, O., Padmanabhan, R., Hild, M., Berry, D.L., Garza, D.,

- Hubbert, C.C., Yao, T.P., Baehrecke, E.H. and Taylor, J.P. (2007) HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, **447**, 859-863.
- Pandolfi, P.P. (2001) In vivo analysis of the molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, **20**, 5726-5735.
- Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., Blobel, G.A. and McMahon, S.B. (2004) The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol*, **24**, 10826-10834.
- Patel, N.A., Kaneko, S., Apostolatos, H.S., Bae, S.S., Watson, J.E., Davidowitz, K., Chappell, D.S., Birnbaum, M.J., Cheng, J.Q. and Cooper, D.R. (2005) Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase CbetaII alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40. *J Biol Chem*, **280**, 14302-14309.
- Peart, M.J., Tainton, K.M., Ruefli, A.A., Dear, A.E., Sedelies, K.A., O'Reilly, L.A., Waterhouse, N.J., Trapani, J.A. and Johnstone, R.W. (2003) Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res*, **63**, 4460-4471.
- Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., Cimino, L., Porcellini, A., Screpanti, I., Balsano, C., Alesse, E., Gulino, A. and Levrero, M. (2003) Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*, **5**, 552-558.
- Peeper, D.S., Keblusek, P., Helin, K., Toebes, M., van der Eb, A.J. and Zantema, A. (1995) Phosphorylation of a specific cdk site in E2F-1 affects its electrophoretic mobility and promotes pRB-binding in vitro. *Oncogene*, **10**, 39-48.
- Peng, X. and Mount, S.M. (1995) Genetic enhancement of RNA-processing defects by a dominant mutation in B52, the Drosophila gene for an SR protein splicing factor. *Mol Cell Biol*, **15**, 6273-6282.
- Phair, R.D. and Misteli, T. (2000) High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, **404**, 604-609.
- Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R. and Vousden, K.H. (1999) E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol Cell*, **4**, 771-781.
- Pickering, M.T. and Kowalik, T.F. (2006) Rb inactivation leads to E2F1-mediated DNA double-strand break accumulation. *Oncogene*, **25**, 746-755.
- Pierce, A.M., Fisher, S.M., Conti, C.J. and Johnson, D.G. (1998a) Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with ras in skin tumor development. *Oncogene*, **16**, 1267-1276.
- Pierce, A.M., Gimenez-Conti, I.B., Schneider-Broussard, R., Martinez, L.A., Conti, C.J. and Johnson, D.G. (1998b) Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *PNAS*, **95**, 8858-8863.
- Pierce, A.M., Schneider-Broussard, R., Gimenez-Conti, I.B., Russell, J.L., Conti, C.J. and Johnson, D.G. (1999) E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model. *Mol Cell Biol*, **19**, 6408-6414.



Pinol-Roma, S. and Dreyfuss, G. (1992) Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature*, **355**, 730-732.

Platta, C.S., Greenblatt, D.Y., Kunnimalaiyaan, M. and Chen, H. (2007) The HDAC inhibitor trichostatin A inhibits growth of small cell lung cancer cells. *J Surg Res*, **142**, 219-226.

Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E. and Ginsberg, D. (2002) E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene*, **21**, 437-446.

Prasad, J., Colwill, K., Pawson, T. and Manley, J.L. (1999) The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol Cell Biol*, **19**, 6991-7000.

Prasad, J. and Manley, J.L. (2003) Regulation and substrate specificity of the SR protein kinase Clk/Sty. *Mol Cell Biol*, **23**, 4139-4149.

## Q

Qin, G., Kishore, R., Dolan, C.M., Silver, M., Wecker, A., Luedemann, C.N., Thorne, T., Hanley, A., Curry, C., Heyd, L., Dinesh, D., Kearney, M., Martelli, F., Murayama, T., Goukassian, D.A., Zhu, Y. and Losordo, D.W. (2006) Cell cycle regulator E2F1 modulates angiogenesis via p53-dependent transcriptional control of VEGF. *PNAS*, **103**, 11015-11020.

## R

Ramirez, A., Bravo, A., Jorcano, J.L. and Vidal, M. (1994) Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation*, **58**, 53-64.

Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M.B. and Gutierrez, C. (1999) The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res*, **27**, 3527-3533.

Rasheva, V.I., Knight, D., Bozko, P., Marsh, K. and Frolov, M.V. (2006) Specific role of the SR protein splicing factor B52 in cell cycle control in *Drosophila*. *Mol Cell Biol*, **26**, 3468-3477.

Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A. and Dynlacht, B.D. (2002) E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev*, **16**, 245-256.

Ring, H.Z. and Lis, J.T. (1994) The SR protein B52/SRp55 is essential for *Drosophila* development. *Mol Cell Biol*, **14**, 7499-7506.

Rizos, H., Scurr, L.L., Irvine, M., Alling, N.J. and Kefford, R.F. (2007) p14ARF regulates E2F-1 ubiquitination and degradation via a p53-dependent mechanism. *Cell Cycle*, **6**, 1741-1747.

Robert, F., Blanchette, M., Maes, O., Chabot, B. and Coulombe, B. (2002) A human RNA polymerase II-containing complex associated with factors necessary for spliceosome assembly. *J Biol Chem*, **277**, 9302-9306.

- Robertson, K.D. and Jones, P.A. (1998) The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol Cell Biol*, **18**, 6457-6473.
- Rodicker, F., Stiewe, T., Zimmermann, S. and Putzer, B.M. (2001) Therapeutic efficacy of E2F1 in pancreatic cancer correlates with TP73 induction. *Cancer Res*, **61**, 7052-7055.
- Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Debatis, M.E., Jones, S. and Kowalik, T.F. (2002) E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis. *Mol Cell Biol*, **22**, 5308-5318.
- Rosato, R.R., Almenara, J.A., Dai, Y. and Grant, S. (2003) Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther*, **2**, 1273-1284.
- Roscigno, R.F. and Garcia-Blanco, M.A. (1995) SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome. *Rna*, **1**, 692-706.
- Ross, J.F., Liu, X. and Dynlacht, B.D. (1999) Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol Cell*, **3**, 195-205.
- Rossignol, P., Stevens, R., Perennes, C., Jasinski, S., Cella, R., Tremousaygue, D. and Bergounioux, C. (2002) AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce Arabidopsis leaf cells to re-enter S phase. *Mol Genet Genomics*, **266**, 995-1003.
- Roth, M.B., Murphy, C. and Gall, J.G. (1990) A monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope stains lampbrush chromosome loops and small granules in the amphibian germinal vesicle. *J Cell Biol*, **111**, 2217-2223.
- Rowen, L., Young, J., Birditt, B., Kaur, A., Madan, A., Philipps, D.L., Qin, S., Minx, P., Wilson, R.K., Hood, L. and Graveley, B.R. (2002) Analysis of the human neurexin genes: alternative splicing and the generation of protein diversity. *Genomics*, **79**, 587-597.
- Rubin, S.M., Gall, A.L., Zheng, N. and Pavletich, N.P. (2005) Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release. *Cell*, **123**, 1093-1106.
- Russell, J.L., Weakes, R.L., Berton, T.R. and Johnson, D.G. (2006) E2F1 suppresses skin carcinogenesis via the ARF-p53 pathway. *Oncogene*, **25**, 867-876.

## S

- Sadoul, K., Boyault, C., Pabion, M. and Khochbin, S. (2008) Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie*, **90**, 306-312.
- Saji, S., Kawakami, M., Hayashi, S., Yoshida, N., Hirose, M., Horiguchi, S., Itoh, A., Funata, N., Schreiber, S.L., Yoshida, M. and Toi, M. (2005) Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*, **24**, 4531-4539.

- Sakuma, T., Uzawa, K., Onda, T., Shiiba, M., Yokoe, H., Shibahara, T. and Tanzawa, H. (2006) Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, **29**, 117-124.
- Salon, C., Eymin, B., Micheau, O., Chaperot, L., Plumas, J., Brambilla, C., Brambilla, E. and Gazzeri, S. (2006) E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ*, **13**, 260-272.
- Sanchez, G., Delattre, O., Auboeuf, D. and Dutertre, M. (2008) Coupled alteration of transcription and splicing by a single oncogene: boosting the effect on cyclin D1 activity. *Cell Cycle*, **7**, 2299-2305.
- Sanford, J.R. and Bruzik, J.P. (1999) Developmental regulation of SR protein phosphorylation and activity. *Genes Dev*, **13**, 1513-1518.
- Sanford, J.R., Coutinho, P., Hackett, J.A., Wang, X., Ranahan, W. and Caceres, J.F. (2008) Identification of nuclear and cytoplasmic mRNA targets for the shuttling protein SF2/ASF. *PLoS One*, **3**, e3369.
- Sanford, J.R., Ellis, J. and Caceres, J.F. (2005) Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing. *Biochem Soc Trans*, **33**, 443-446.
- Sanford, J.R., Gray, N.K., Beckmann, K. and Caceres, J.F. (2004) A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev*, **18**, 755-768.
- Sanz, G., Mir, L. and Jacquemin-Sablon, A. (2002) Bleomycin resistance in mammalian cells expressing a genetic suppressor element derived from the SRPK1 gene. *Cancer Res*, **62**, 4453-4458.
- Sapountzi, V., Logan, I.R. and Robson, C.N. (2006) Cellular functions of TIP60. *Int J Biochem Cell Biol*, **38**, 1496-1509.
- Sapra, A.K., Anko, M.L., Grishina, I., Lorenz, M., Pabis, M., Poser, I., Rollins, J., Weiland, E.M. and Neugebauer, K.M. (2009) SR protein family members display diverse activities in the formation of nascent and mature mRNPs in vivo. *Mol Cell*, **34**, 179-190.
- Saunders, L.R. and Verdin, E. (2007) Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, **26**, 5489-5504.
- Schenk, P.W., Stoop, H., Bokemeyer, C., Mayer, F., Stoter, G., Oosterhuis, J.W., Wiemer, E., Looijenga, L.H. and Nooter, K. (2004) Resistance to platinum-containing chemotherapy in testicular germ cell tumors is associated with downregulation of the protein kinase SRPK1. *Neoplasia*, **6**, 297-301.
- Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E. and Zipursky, S.L. (2000) Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*, **101**, 671-684.
- Schwartz, S., Meshorer, E. and Ast, G. (2009) Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 990-995.
- Schwarz, J.K., Bassing, C.H., Kovesdi, I., Datto, M.B., Blazing, M., George, S., Wang, X.F. and Nevins, J.R. (1995) Expression of the E2F1 transcription factor overcomes type beta transforming growth factor-mediated growth suppression. *PNAS*, **92**, 483-487.

- Schwerk, C. and Schulze-Osthoff, K. (2005) Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, **19**, 1-13.
- Screaton, G.R., Caceres, J.F., Mayeda, A., Bell, M.V., Plebanski, M., Jackson, D.G., Bell, J.I. and Krainer, A.R. (1995) Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors. *Embo J*, **14**, 4336-4349.
- Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol*, **21**, 8035-8044.
- Seo, S.B., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W.S. and Chakravarti, D. (2001) Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell*, **104**, 119-130.
- Shahbazian, M.D. and Grunstein, M. (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*, **76**, 75-100.
- Shan, B. and Lee, W.H. (1994) Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol Cell Biol*, **14**, 8166-8173.
- Shen, H., Kan, J.L. and Green, M.R. (2004) Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Mol Cell*, **13**, 367-376.
- Shepard, P.J. and Hertel, K.J. (2009) The SR protein family. *Genome Biol*, **10**, 242.
- Shi, J., Hu, Z., Pabon, K. and Scotto, K.W. (2008) Caffeine regulates alternative splicing in a subset of cancer-associated genes: a role for SC35. *Mol Cell Biol*, **28**, 883-895.
- Shi, Y. and Manley, J.L. (2007) A complex signaling pathway regulates SRp38 phosphorylation and pre-mRNA splicing in response to heat shock. *Mol Cell*, **28**, 79-90.
- Shi, Y., Reddy, B. and Manley, J.L. (2006) PP1/PP2A phosphatases are required for the second step of Pre-mRNA splicing and target specific snRNP proteins. *Mol Cell*, **23**, 819-829.
- Shimazu, T., Komatsu, Y., Nakayama, K.I., Fukazawa, H., Horinouchi, S. and Yoshida, M. (2006) Regulation of SV40 large T-antigen stability by reversible acetylation. *Oncogene*, **25**, 7391-7400.
- Shin, C., Kleiman, F.E. and Manley, J.L. (2005) Multiple properties of the splicing repressor SRp38 distinguish it from typical SR proteins. *Mol Cell Biol*, **25**, 8334-8343.
- Sims, R.J., 3rd, Millhouse, S., Chen, C.F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L. and Reinberg, D. (2007) Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, **28**, 665-676.
- Singh, P., Wong, S.H. and Hong, W. (1994) Overexpression of E2F-1 in rat embryo fibroblasts leads to neoplastic transformation. *Embo J*, **13**, 3329-3338.
- Sinha, R., Allemand, E., Zhang, Z., Karni, R., Myers, M.P. and Krainer, A.R. (2010) Arginine Methylation Controls the Subcellular Localization and Functions of the Oncoprotein Splicing Factor SF2/ASF. *Mol Cell Biol*.

- Smith, C.W. and Valcarcel, J. (2000) Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci*, **25**, 381-388.
- Solis, A.S., Peng, R., Crawford, J.B., Phillips, J.A., 3rd and Patton, J.G. (2008) Growth hormone deficiency and splicing fidelity: two serine/arginine-rich proteins, ASF/SF2 and SC35, act antagonistically. *J Biol Chem*, **283**, 23619-23626.
- Song, J., Noh, J.H., Lee, J.H., Eun, J.W., Ahn, Y.M., Kim, S.Y., Lee, S.H., Park, W.S., Yoo, N.J., Lee, J.Y. and Nam, S.W. (2005) Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *Apmis*, **113**, 264-268.
- Soret, J., Gabut, M., Dupon, C., Kohlhagen, G., Stevenin, J., Pommier, Y. and Tazi, J. (2003) Altered serine/arginine-rich protein phosphorylation and exonic enhancer-dependent splicing in Mammalian cells lacking topoisomerase I. *Cancer Res*, **63**, 8203-8211.
- Soret, J., Gattoni, R., Guyon, C., Sureau, A., Popielarz, M., Le Rouzic, E., Dumon, S., Apiou, F., Dutrillaux, B., Voss, H., Ansorge, W., Stevenin, J. and Perbal, B. (1998) Characterization of SRp46, a novel human SR splicing factor encoded by a PR264/SC35 retropseudogene. *Mol Cell Biol*, **18**, 4924-4934.
- Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T. and Kramer, O.H. (2009) Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 185-198.
- Spector, D.L., Fu, X.D. and Maniatis, T. (1991) Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *Embo J*, **10**, 3467-3481.
- Squatrito, M., Gorrini, C. and Amati, B. (2006) Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol*, **16**, 433-442.
- Srebrow, A. and Kornblihtt, A.R. (2006) The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci*, **119**, 2635-2641.
- Stamm, S. (2008) Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem*, **283**, 1223-1227.
- Stevaux, O. and Dyson, N.J. (2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 684-691.
- Stevens, C. and La Thangue, N.B. (2004) The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1071-1079.
- Stevens, C., Smith, L. and La Thangue, N.B. (2003) Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*, **5**, 401-409.
- Stickeler, E., Kittrell, F., Medina, D. and Berget, S.M. (1999) Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. *Oncogene*, **18**, 3574-3582.
- Stiewe, T. and Putzer, B.M. (2000) Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet*, **26**, 464-469.

Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N. and Price, B.D. (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *PNAS*, **102**, 13182-13187.

Sun, Y., Jiang, X. and Price, B.D. (2010) Tip60: connecting chromatin to DNA damage signaling. *Cell Cycle*, **9**, 930-936.

Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstone, J.R. and Price, B.D. (2009) Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat Cell Biol*, **11**, 1376-1382.

Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stevenin, J. and Soret, J. (2001) SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *Embo J*, **20**, 1785-1796.

Suzuki, A. and Hemmati-Brivanlou, A. (2000) Xenopus embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis. *Mol Cell*, **5**, 217-229.

Swartz, J.E., Bor, Y.C., Misawa, Y., Rekosh, D. and Hammarskjold, M.L. (2007) The shuttling SR protein 9G8 plays a role in translation of unspliced mRNA containing a constitutive transport element. *J Biol Chem*, **282**, 19844-19853.

Szekelyhidi, Z., Pato, J., Waczek, F., Banhegyi, P., Hegymegi-Barakonyi, B., Eros, D., Meszaros, G., Hollosy, F., Hafenbradl, D., Obert, S., Klebl, B., Keri, G. and Orfi, L. (2005) Synthesis of selective SRPK-1 inhibitors: novel tricyclic quinoxaline derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, **15**, 3241-3246.

## T

Tacke, R., Chen, Y. and Manley, J.L. (1997) Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: creation of an SRp40-specific splicing enhancer. *PNAS*, **94**, 1148-1153.

Tacke, R. and Manley, J.L. (1995) The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities. *Embo J*, **14**, 3540-3551.

Tacke, R. and Manley, J.L. (1999) Determinants of SR protein specificity. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 358-362.

Tamburini, B.A. and Tyler, J.K. (2005) Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. *Mol Cell Biol*, **25**, 4903-4913.

Tang, Y., Luo, J., Zhang, W. and Gu, W. (2006) Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell*, **24**, 827-839.

Tarn, W.Y. and Steitz, J.A. (1995) Modulation of 5' splice site choice in pre-messenger RNA by two distinct steps. *PNAS*, **92**, 2504-2508.

Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S.R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M. and Amati, B. (2004) E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol*, **24**, 4546-4556.

- Teigelkamp, S., Mundt, C., Achsel, T., Will, C.L. and Luhrmann, R. (1997) The human U5 snRNP-specific 100-kD protein is an RS domain-containing, putative RNA helicase with significant homology to the yeast splicing factor Prp28p. *Rna*, **3**, 1313-1326.
- Tenenbaum, S.A. and Aguirre-Ghiso, J. (2005) Dephosphorylation shows SR proteins the way out. *Mol Cell*, **20**, 499-501.
- Theoleyre, O. and Baklouti, F. (2004) [Oncogenic transcription factors as splicing regulators]. *Med Sci (Paris)*, **20**, 1014-1019.
- Tian, M. and Maniatis, T. (1993) A splicing enhancer complex controls alternative splicing of doublesex pre-mRNA. *Cell*, **74**, 105-114.
- Tilgner, H., Nikolaou, C., Althammer, S., Sammeth, M., Beato, M., Valcarcel, J. and Guigo, R. (2009) Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 996-1001.
- Tolbert, D., Lu, X., Yin, C., Tantama, M. and Van Dyke, T. (2002) p19(ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53-mediated apoptosis and tumor suppression in vivo. *Mol Cell Biol*, **22**, 370-377.
- Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Wen, J. and Lees, J.A. (2001) The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *PNAS*, **98**, 1519-1524.
- Trimarchi, J.M. and Lees, J.A. (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 11-20.
- Trinkle-Mulcahy, L., Andrews, P.D., Wickramasinghe, S., Sleeman, J., Prescott, A., Lam, Y.W., Lyon, C., Swedlow, J.R. and Lamond, A.I. (2003) Time-lapse imaging reveals dynamic relocalization of PP1gamma throughout the mammalian cell cycle. *Mol Biol Cell*, **14**, 107-117.
- Tripathi, K. and Parnaik, V.K. (2008) Differential dynamics of splicing factor SC35 during the cell cycle. *J Biosci*, **33**, 345-354.
- Trouche, D., Cook, A. and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator stimulates E2F1/DP1 activity. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4139-4145.
- Trouche, D. and Kouzarides, T. (1996) E2F1 and E1A(12S) have a homologous activation domain regulated by RB and CBP. *PNAS*, **93**, 1439-1442.
- Tsantoulis, P.K. and Gorgoulis, V.G. (2005) Involvement of E2F transcription factor family in cancer. *Eur J Cancer*, **41**, 2403-2414.
- Tuduri, S., Crabbe, L., Conti, C., Tourriere, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantesco, V., De Vos, J., Thomas, A., Theillet, C., Pommier, Y., Tazi, J., Coquelle, A. and Pasero, P. (2009) Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat Cell Biol*, **11**, 1315-1324.
- Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.
- Tyagi, S., Chabes, A.L., Wysocka, J. and Herr, W. (2007) E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell*, **27**, 107-119.

## U

Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M.V. and Prives, C. (2004) p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev*, **18**, 3041-3054.

## V

Van Lint, C., Emiliani, S. and Verdin, E. (1996) The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr*, **5**, 245-253.

Venables, J.P. (2006) Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *Bioessays*, **28**, 378-386.

Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M.P., Rousseaux, S., Lemercier, C., Yoshida, M. and Khochbin, S. (2000) Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol*, **10**, 747-749.

Verdel, A. and Khochbin, S. (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem*, **274**, 2440-2445.

Verdin, E., Dequiedt, F. and Kasler, H.G. (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet*, **19**, 286-293.

Verona, R., Moberg, K., Estes, S., Starz, M., Vernon, J.P. and Lees, J.A. (1997) E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol Cell Biol*, **17**, 7268-7282.

Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J. and Luscher, B. (2006) The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *J Biol Chem*, **281**, 34725-34729.

Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C. and Helin, K. (1999) CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol*, **19**, 6379-6395.

## W

Wang, A., Schneider-Broussard, R., Kumar, A.P., MacLeod, M.C. and Johnson, D.G. (2000a) Regulation of BRCA1 expression by the Rb-E2F pathway. *J Biol Chem*, **275**, 4532-4536.

Wang, D., Russell, J.L. and Johnson, D.G. (2000b) E2F4 and E2F1 have similar proliferative properties but different apoptotic and oncogenic properties in vivo. *Mol Cell Biol*, **20**, 3417-3424.

Wang, J., Xiao, S.H. and Manley, J.L. (1998a) Genetic analysis of the SR protein ASF/SF2: interchangeability of RS domains and negative control of splicing. *Genes Dev*, **12**, 2222-2233.

Wang, H.Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C. and Fu, X.D. (1998b) SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol*, **140**, 737-750.



- Wang, H.Y., Xu, X., Ding, J.H., Bermingham, J.R., Jr. and Fu, X.D. (2001) SC35 plays a role in T cell development and alternative splicing of CD45. *Mol Cell*, **7**, 331-342.
- Wang, J. and Manley, J.L. (1995) Overexpression of the SR proteins ASF/SF2 and SC35 influences alternative splicing in vivo in diverse ways. *Rna*, **1**, 335-346.
- Wang, J., Takagaki, Y. and Manley, J.L. (1996) Targeted disruption of an essential vertebrate gene: ASF/SF2 is required for cell viability. *Genes Dev*, **10**, 2588-2599.
- Wang, X., Taplick, J., Geva, N. and Oren, M. (2004) Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation. *FEBS Lett*, **561**, 195-201.
- Wang, Z., Lo, H.S., Yang, H., Gere, S., Hu, Y., Buetow, K.H. and Lee, M.P. (2003) Computational analysis and experimental validation of tumor-associated alternative RNA splicing in human cancer. *Cancer Res*, **63**, 655-657.
- Wei, X., Somanathan, S., Samarabandu, J. and Berezney, R. (1999) Three-dimensional visualization of transcription sites and their association with splicing factor-rich nuclear speckles. *J Cell Biol*, **146**, 543-558.
- Weichert, W., Roske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Stephan, C., Jung, K., Fritzsche, F.R., Niesporek, S., Denkert, C., Dietel, M. and Kristiansen, G. (2008) Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br J Cancer*, **98**, 604-610.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323-330.
- Wells, J., Yan, P.S., Cechvala, M., Huang, T. and Farnham, P.J. (2003) Identification of novel pRb binding sites using CpG microarrays suggests that E2F recruits pRb to specific genomic sites during S phase. *Oncogene*, **22**, 1445-1460.
- Westendorf, J.J., Zaidi, S.K., Cascino, J.E., Kahler, R., van Wijnen, A.J., Lian, J.B., Yoshida, M., Stein, G.S. and Li, X. (2002) Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Mol Cell Biol*, **22**, 7982-7992.
- Wieczorek, D.F. (1988) Regulation of alternatively spliced alpha-tropomyosin gene expression by nerve extract. *J Biol Chem*, **263**, 10456-10463.
- Wikonkal, N.M., Remenyik, E., Knezevic, D., Zhang, W., Liu, M., Zhao, H., Berton, T.R., Johnson, D.G. and Brash, D.E. (2003) Inactivating E2f1 reverts apoptosis resistance and cancer sensitivity in Trp53-deficient mice. *Nat Cell Biol*, **5**, 655-660.
- Wilson, A.J., Byun, D.S., Popova, N., Murray, L.B., L'Italien, K., Sowa, Y., Arango, D., Velcich, A., Augenlicht, L.H. and Mariadason, J.M. (2006) Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem*, **281**, 13548-13558.
- Witzig, T.E., Timm, M., Stenson, M., Svingen, P.A. and Kaufmann, S.H. (2000) Induction of apoptosis in malignant B cells by phenylbutyrate or phenylacetate in combination with chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res*, **6**, 681-692.

Wu, H., Sun, S., Tu, K., Gao, Y., Xie, B., Krainer, A.R. and Zhu, J. (2010) A splicing-independent function of SF2/ASF in microRNA processing. *Mol Cell*, **38**, 67-77.

Wu, J.Y. and Maniatis, T. (1993) Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell*, **75**, 1061-1070.

Wu, X. and Levine, A.J. (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *PNAS*, **91**, 3602-3606.

## X

Xi, L., Feber, A., Gupta, V., Wu, M., Bergemann, A.D., Landreneau, R.J., Litle, V.R., Pennathur, A., Luketich, J.D. and Godfrey, T.E. (2008) Whole genome exon arrays identify differential expression of alternatively spliced, cancer-related genes in lung cancer. *Nucleic Acids Res*, **36**, 6535-6547.

Xiao, H., Chung, J., Kao, H.Y. and Yang, Y.C. (2003) Tip60 is a co-repressor for STAT3. *J Biol Chem*, **278**, 11197-11204.

Xiao, R., Sun, Y., Ding, J.H., Lin, S., Rose, D.W., Rosenfeld, M.G., Fu, X.D. and Li, X. (2007) Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and cell proliferation during mammalian organogenesis. *Mol Cell Biol*, **27**, 5393-5402.

Xiao, S.H. and Manley, J.L. (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev*, **11**, 334-344.

Xu, G., Livingston, D.M. and Krek, W. (1995) Multiple members of the E2F transcription factor family are the products of oncogenes. *PNAS*, **92**, 1357-1361.

Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S. and Piwnica-Worms, H. (1994) Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **14**, 8420-8431.

Xu, Q. and Lee, C. (2003) Discovery of novel splice forms and functional analysis of cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5635-5643.

Xu, W.S., Parmigiani, R.B. and Marks, P.A. (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, **26**, 5541-5552.

Xu, X., Yang, D., Ding, J.H., Wang, W., Chu, P.H., Dalton, N.D., Wang, H.Y., Bermingham, J.R., Jr., Ye, Z., Liu, F., Rosenfeld, M.G., Manley, J.L., Ross, J., Jr., Chen, J., Xiao, R.P., Cheng, H. and Fu, X.D. (2005) ASF/SF2-regulated CaMKII $\delta$  alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Cell*, **120**, 59-72.

## Y

Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E. and Dyson, N.J. (1996) Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell*, **85**, 537-548.

Yan, Z., DeGregori, J., Shohet, R., Leone, G., Stillman, B., Nevins, J.R. and Williams, R.S. (1998) Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *PNAS*, **95**, 3603-3608.

Yang, G., Thompson, M.A., Brandt, S.J. and Hiebert, S.W. (2007) Histone deacetylase inhibitors induce the degradation of the t(8;21) fusion oncoprotein. *Oncogene*, **26**, 91-101.

Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, **382**, 319-324.

Yang, X.J. and Seto, E. (2007) HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, **26**, 5310-5318.

Yang, X.J. and Seto, E. (2008) Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*, **31**, 449-461.

Yeakley, J.M., Tronchere, H., Olesen, J., Dyck, J.A., Wang, H.Y. and Fu, X.D. (1999) Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol*, **145**, 447-455.

Yee, A.S., Reichel, R., Kovetski, I. and Nevins, J.R. (1987) Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex. *Embo J*, **6**, 2061-2068.

Yoshida, N., Omoto, Y., Inoue, A., Eguchi, H., Kobayashi, Y., Kurosumi, M., Saji, S., Suemasu, K., Okazaki, T., Nakachi, K., Fujita, T. and Hayashi, S. (2004) Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes. *Cancer Sci*, **95**, 496-502.

Young, A.P., Nagarajan, R. and Longmore, G.D. (2003) Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway. *Oncogene*, **22**, 7209-7217.

Yu, X., Guo, Z.S., Marcu, M.G., Neckers, L., Nguyen, D.M., Chen, G.A. and Schrupp, D.S. (2002) Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228. *J Natl Cancer Inst*, **94**, 504-513.

## Z

Zacharatos, P., Kotsinas, A., Evangelou, K., Karakaidos, P., Vassiliou, L.V., Rezaei, N., Kyroudi, A., Kittas, C., Patsouris, E., Papavassiliou, A.G. and Gorgoulis, V.G. (2004) Distinct expression patterns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas. *J Pathol*, **203**, 744-753.

Zahler, A.M., Lane, W.S., Stolk, J.A. and Roth, M.B. (1992) SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev*, **6**, 837-847.

Zahler, A.M., Neugebauer, K.M., Stolk, J.A. and Roth, M.B. (1993) Human SR proteins and isolation of a cDNA encoding SRp75. *Mol Cell Biol*, **13**, 4023-4028.

Zalmas, L.P., Zhao, X., Graham, A.L., Fisher, R., Reilly, C., Coutts, A.S. and La Thangue, N.B. (2008) DNA-damage response control of E2F7 and E2F8. *EMBO Rep*, **9**, 252-259.

Zeng, C. and Berget, S.M. (2000) Participation of the C-terminal domain of RNA polymerase II in exon definition during pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol*, **20**, 8290-8301.

- Zerbe, L.K., Pino, I., Pio, R., Cospes, P.F., Dwyer-Nield, L.D., Meyer, A.M., Port, J.D., Montuenga, L.M. and Malkinson, A.M. (2004) Relative amounts of antagonistic splicing factors, hnRNP A1 and ASF/SF2, change during neoplastic lung growth: implications for pre-mRNA processing. *Mol Carcinog*, **41**, 187-196.
- Zhang, G., Taneja, K.L., Singer, R.H. and Green, M.R. (1994) Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei. *Nature*, **372**, 809-812.
- Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J.T., Yang, X.J., Dent, S.R., Yao, T.P., Lane, W.S. and Seto, E. (2007a) HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell*, **27**, 197-213.
- Zhang, Z., Stanfield, J., Frenkel, E., Kabbani, W. and Hsieh, J.T. (2007b) Enhanced therapeutic effect on androgen-independent prostate cancer by depsipeptide (FK228), a histone deacetylase inhibitor, in combination with docetaxel. *Urology*, **70**, 396-401.
- Zhang, X.H. and Chasin, L.A. (2006) Comparison of multiple vertebrate genomes reveals the birth and evolution of human exons. *PNAS*, **103**, 13427-13432.
- Zhang, Y., Gilquin, B., Khochbin, S. and Matthias, P. (2006) Two catalytic domains are required for protein deacetylation. *J Biol Chem*, **281**, 2401-2404.
- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S. and Matthias, P. (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *Embo J*, **22**, 1168-1179.
- Zhang, Z. and Krainer, A.R. (2004) Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Mol Cell*, **16**, 597-607.
- Zhong, X.Y., Ding, J.H., Adams, J.A., Ghosh, G. and Fu, X.D. (2009) Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes Dev*, **23**, 482-495.
- Ziebold, U., Reza, T., Caron, A. and Lees, J.A. (2001) E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes Dev*, **15**, 386-391.
- Zou, H., Wu, Y., Navre, M. and Sang, B.C. (2006) Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochem Biophys Res Commun*, **341**, 45-50.
- Zuo, P. and Manley, J.L. (1993) Functional domains of the human splicing factor ASF/SF2. *Embo J*, **12**, 4727-4737.

# E2F1 MODIFIE L'EXPRESSION DES VARIANTS D'ÉPISSAGE PRO- VERSUS ANTI-ANGIOGENIQUES DU VEGF-A DANS LES LIGNÉES CELLULAIRES DE CARCINOME PULMONAIRE HUMAINES

Au cours de ma thèse, j'ai contribué à cette étude en participant notamment aux expériences « *in vivo* » de xéno-transplantation de cellules tumorales sur souris nude.

## a) Présentation de l'étude

Le VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) est l'un des plus puissants facteurs angiogéniques et il se trouve surexprimé dans un grand nombre de tumeurs. Dans la plupart des tissus, VEGF-A existe sous la forme de multiples isoformes protéiques angiogéniques, résultant de l'épissage alternatif de son pré-ARNm et dénommées VEGF<sub>xxx</sub>. De façon intéressante, une nouvelle famille d'isoformes du VEGF-A a été identifiée récemment. Ces isoformes, nommées VEGF<sub>xxx</sub>b, possèdent des fonctions anti-angiogéniques et sont sous-exprimées dans certaines tumeurs. Actuellement, les voies de signalisation et les facteurs protéiques contrôlant l'épissage alternatif des isoformes VEGF<sub>xxx</sub>, ainsi que le « switch » entre les isoformes anti-angiogéniques et pro-angiogéniques du VEGF-A sont inconnus.

Ayant montré un rôle de E2F1 dans le contrôle de l'épissage alternatif de transcrits régulant l'apoptose en coopération avec le facteur d'épissage SC35, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle E2F1 pourrait aussi affecter l'épissage alternatif des isoformes du VEGF-A dans nos modèles d'étude. Afin de rechercher un tel effet de E2F1, nous avons utilisé notre modèle cellulaire de clones stables H358 inductibles par la doxycycline pour l'expression de E2F1 n'exprimant pas p53, les lignées H1299 (adénocarcinome pulmonaire) et SAOS2 (ostéosarcome humain), ainsi que les lignées cellulaires H69 et H810 qui surexpriment E2F1, dans lesquelles nous avons neutralisé son expression par ARN interférence.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que E2F1 contrôle négativement l'expression des isoformes angiogéniques du VEGF-A sans effet distinct sur l'une ou l'autre des isoformes testées. De plus, nous avons montré que E2F1 réprime l'activité du promoteur

du VEGF-A dans ces lignées dépourvues de p53 fonctionnelle. A l'inverse, et de façon inattendue, nous avons montré par RT-PCR, RT-qPCR et Western-blot que E2F1 ne régule pas négativement l'expression des variants anti-angiogéniques VEGF<sub>xxx</sub>b. Ces résultats indiquent que E2F1 module le ratio VEGF<sub>xxx</sub>/VEGF<sub>xxx</sub>b en faveur des isoformes anti-angiogéniques. De façon importante, nous avons confirmé ces résultats « *in vivo* » dans un modèle de xénogreffe chez la souris nude. Concernant le rôle de SC35, nous avons obtenu des résultats indiquant une modification de la balance des isoformes VEGF<sub>xxx</sub>/VEGF<sub>xxx</sub>b distincte selon le modèle cellulaire envisagé.

## b) Article

The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus anti-angiogenic isoforms of VEGF-A to inhibit neovascularisation *in vivo*. **Oncogene**. Merdzhanova G, Gout S, Keramidas M, Edmond V, Coll JL, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S and Eymin B. *Sous presse*.

ORIGINAL ARTICLE

# The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization *in vivo*

G Merdzhanova<sup>1,2,4</sup>, S Gout<sup>1,2</sup>, M Keramidas<sup>2,3</sup>, V Edmond<sup>1,2</sup>, J-L Coll<sup>2,3</sup>, C Brambilla<sup>1,2</sup>, E Brambilla<sup>1,2</sup>, S Gazzeri<sup>1,2</sup> and B Eymin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, France; <sup>2</sup>Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France and <sup>3</sup>INSERM, U823, Equipe 5 Cibles Thérapeutiques et Diagnostiques et Vectorisation de Drogues dans le Cancer du Poumon, Grenoble, France

The transcription factor E2F1 has a crucial role in the control of cell growth and has been shown to regulate neoangiogenesis in a p53-dependent manner through inhibition of activity of the VEGF-A (vascular endothelial growth factor) promoter. Besides being regulated by transcription, VEGF-A is also highly regulated by pre-mRNA alternative splicing, resulting in the expression of several VEGF isoforms with either pro-(VEGF<sub>xxx</sub>) or anti-(VEGF<sub>xxx</sub>b) angiogenic properties. Recently, we identified the SR (Ser-Rich/Arg) protein SC35, a splicing factor, as a new transcriptional target of E2F1. Here, we show that E2F1 downregulates the activity of the VEGF-A promoter in tumour cells independently of p53, leading to a strong decrease in VEGF<sub>xxx</sub> mRNA levels. We further show that, strikingly, E2F1 alters the ratio of pro-VEGF<sub>xxx</sub> versus anti-VEGF<sub>xxx</sub>b angiogenic isoforms, favouring the antiangiogenic isoforms, by a mechanism involving the induction of SC35 expression. Finally, using lung tumour xenografts in nude mice, we provide evidence that E2F1 and SC35 proteins increase the VEGF<sub>165</sub>b/VEGF ratio and decrease tumour neovascularization *in vivo*. Overall, these findings highlight E2F1 and SC35 as two regulators of the VEGF<sub>xxx</sub>/VEGF<sub>xxx</sub>b angiogenic switch in human cancer cells, a role that could be crucial during tumour progression, as well as in tumour response to antiangiogenic therapies.

*Oncogene* advance online publication, 19 July 2010; doi:10.1038/onc.2010.281

**Keywords:** alternative splicing; angiogenesis; cancer; E2F1; SC35; VEGF-A

## Introduction

Angiogenesis occurs physiologically during reproduction, embryonic development and wound repair. Furthermore,

it also contributes to several pathological processes, including arthritis, atherosclerosis, diabetes and cancer (Carmeliet and Jain, 2000; Folkman, 2007). VEGF-A (vascular endothelial growth factor) is the most angiogenic of the vascular growth factors. In tumours, VEGF-A is upregulated by hypoxia (Shweiki *et al.*, 1992) or by the overexpression of oncogenes (Rak *et al.*, 1995), and it stimulates the proliferation and migration of endothelial cells, the sprouting of blood vessels and the generation of new vessels, resulting in sustained blood flow, oxygen supply and waste removal from the growing tumours (Ferrara *et al.*, 2003). In addition, VEGF-A regulates the function and physiology of some cancer cells themselves, by acting as an autocrine survival factor (Bachelder *et al.*, 2001, 2002). The importance of VEGF-A in cancer is attested by the use of anti-VEGF antibodies that have shown clinical benefits in colorectal, renal, breast and lung cancer (Hurwitz *et al.*, 2004, 2005).

VEGF-A exists as multiple isoforms, which are generically referred to as VEGF<sub>xxx</sub> and result from the pre-mRNA alternative splicing of eight exons (Robinson and Stringer, 2001). Alternative splicing of VEGF-A was initially shown to generate four different isoforms with 121, 165, 189 and 206 amino acids (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>, respectively). In 2002, a sister family of VEGF-A isoforms termed VEGF<sub>xxx</sub>b was identified (Bates *et al.*, 2002; Ladomery *et al.*, 2007). VEGF<sub>xxx</sub>b isoforms are generated by the use of an alternative 3' splice acceptor site in the final exon 8 of *VEGF-A*, leading to the synthesis of proteins of the same length, but with distinct C-terminal six amino acids (Bates *et al.*, 2002). At the biological level, VEGF<sub>xxx</sub> isoforms are pro-angiogenic and are upregulated in human tumours, whereas VEGF<sub>xxx</sub>b isoforms are antiangiogenic and are downregulated in some tumours (Bates *et al.*, 2002; Woolard *et al.*, 2004; Pritchard-Jones *et al.*, 2007). It has been shown that VEGF<sub>165</sub>b binds VEGFR-2 and inhibits its downstream classical signalling pathway (Woolard *et al.*, 2004; Kawamura *et al.*, 2008). Moreover, VEGF<sub>165</sub>b overexpression inhibits the growth of prostate carcinoma, Ewing's sarcoma and renal cell carcinoma in xenograft mouse tumour models through the inhibition of tumour-cell-mediated

Correspondence: Dr B Eymin, INSERM U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Institut Albert Bonniot, BP170, Iserre, 38042 Grenoble Cedex 09, France.

E-mail: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr

<sup>4</sup>Current address: INSERM, U878, CEA IRTSV/LAPV, Grenoble 38054, France.

Received 13 November 2009; revised 17 May 2010; accepted 4 June 2010

migration and proliferation of endothelial cells (Rennel *et al.*, 2008). Furthermore, VEGF<sub>165</sub>b binds and inhibits Bevacizumab (Avastin), a humanized monoclonal antibody directed against VEGF-A that is currently used in clinics (Varey *et al.*, 2008). As a whole, these data indicate that the balance between pro-(VEGF<sub>xxx</sub>) and anti-(VEGF<sub>xxx</sub>b) angiogenic splice variants of VEGF-A has a critical role in both tumour progression and tumour cell response to antiangiogenic therapies. However, although there has been some investigation of splicing mechanisms in epithelial cells (Cohen *et al.*, 2005; Nowak *et al.*, 2008, 2010), little is known about the proteins and signalling networks that control the splicing of *VEGF-A* pre-mRNA in cancer cells.

The transcription factor E2F1 belongs to the E2F family, which comprises eight members. Initially, studies revealed that E2F1 determines the timely expression of many genes required for S-phase entry and progression. However, it has become clear that transcriptional activation of the S-phase-related genes is only one facet of E2F1 activity. Indeed, E2F1 functions in a wide range of biological processes, including DNA replication, mitosis, DNA repair, cell differentiation and apoptosis (Polager and Ginsberg, 2008). In addition, E2F1 downregulates the activity of the VEGF promoter under hypoxic conditions through a p53-dependent mechanism, unravelling an unexpected function of E2F1 in the control of angiogenesis (Qin *et al.*, 2006). Recently, we established the first link between E2F1- and pre-mRNA-processing events by identifying SC35, a member of the SR (Ser-Rich/Arg) family of proteins that is involved in constitutive and alternative pre-mRNA splicing, as a direct transcriptional target of E2F1 (Merdzhanova *et al.*, 2008). On the basis of these results, we questioned whether E2F1 and/or SC35 proteins could control VEGF-A expression and/or pre-mRNA splicing in p53-deficient tumour cells.

## Results

### *E2F1 downregulates the expression of pro-angiogenic VEGF<sub>xxx</sub> isoforms independently of p53*

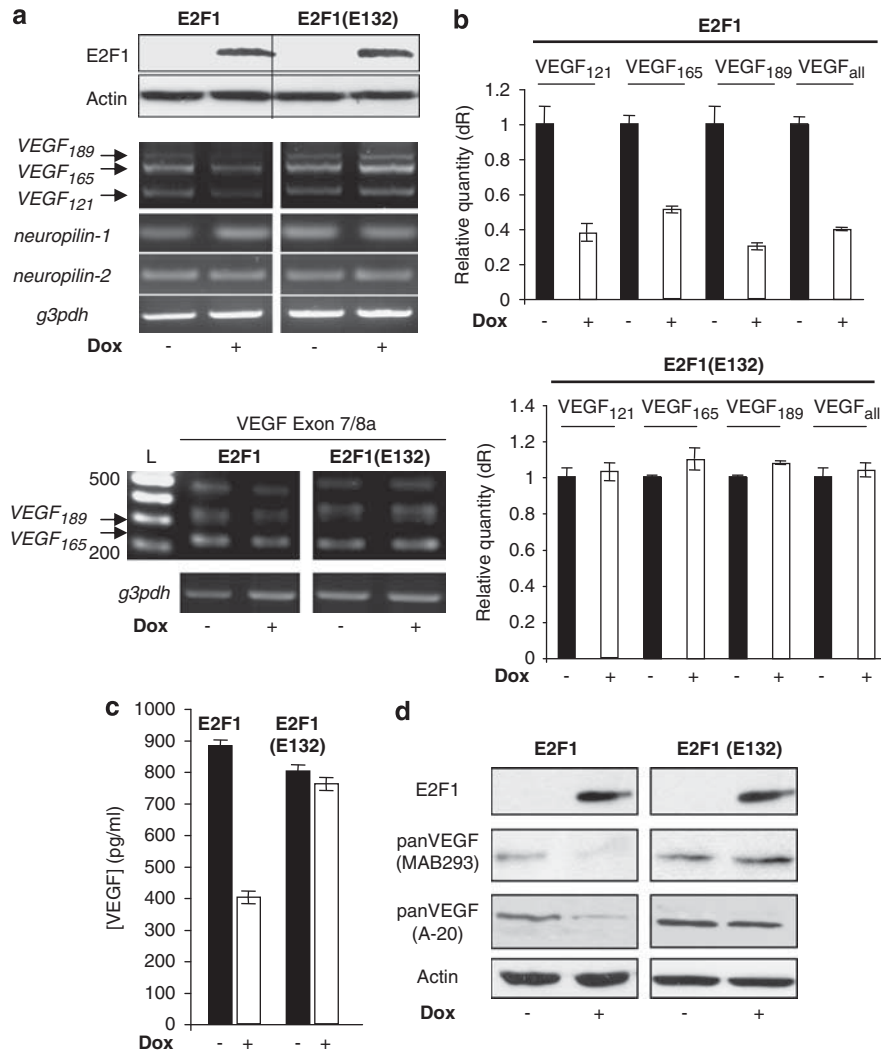
In a murine system, it was previously shown that E2F1 decreases the level of VEGF in a p53-dependent manner (Qin *et al.*, 2006). To test whether E2F1 could also control VEGF expression in human tumour cells deficient in p53, we took advantage of previously established stable E2F1-inducible clones in the H358 cell line derived from a human lung adenocarcinoma. In this system, E2F1 or an E2F1(E132) DNA-binding defective mutant is overexpressed upon doxycycline treatment (Figure 1a, upper panel). As detected by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) analysis, we observed a significant decrease in *VEGF<sub>189</sub>*, *VEGF<sub>165</sub>* and *VEGF<sub>121</sub>* mRNA levels in cells overexpressing E2F1 (Figure 1a, middle panel). The DNA-binding activity of E2F1 was required in this setting, as a similar decrease was not observed when the E2F1 mutant (E132) was overexpressed. Importantly,

we also observed a decrease in both *VEGF<sub>165</sub>* and *VEGF<sub>189</sub>* mRNA levels in E2F1-overexpressing cells when we performed RT–PCR analysis using primers targeting exons 7 and 8a of *VEGF-A* that do not detect VEGF<sub>xxx</sub>b isoforms (Bates *et al.*, 2006; Pritchard-Jones *et al.*, 2007; Varey *et al.*, 2008) (Figure 1a, lower panel). Therefore, these data indicate that E2F1 downregulates the expression level of pro-angiogenic VEGF<sub>xxx</sub> transcripts. To test whether this effect was specific for VEGF<sub>xxx</sub> transcripts, we analysed the expression level of neuropilin-1, the co-receptor of VEGFR-2 that was recently identified as a new E2F1 transcriptional target gene (Jiang *et al.*, 2007). Upon E2F1 overexpression, we found that the level of *neuropilin-1* mRNA was slightly increased, whereas the expression of *neuropilin-2* was not affected (Figure 1a, lower panel). These data indicate that E2F1 specifically decreases the expression of VEGF<sub>xxx</sub> mRNAs. To confirm these results, we performed quantitative RT–PCR (RT–qPCR) experiments using primers detecting either all or each VEGF isoform (Table 1) (Catena *et al.*, 2007). We found that *VEGF<sub>121</sub>*, *VEGF<sub>165</sub>* and *VEGF<sub>189</sub>* mRNA levels significantly decreased upon E2F1 induction, whereas this was not the case with the mutant E2F1(E132) (Figure 1b). To extend these results at the protein level, we quantified the expression of VEGF in supernatants or in total cellular extracts from E2F1- or E2F1(E132)-overexpressing cells using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or western blotting, respectively. We observed that wild-type E2F1 significantly decreased VEGF levels in both the culture medium (Figure 1c) and the cell extracts (Figure 1d), as compared with mutant E2F1(E132), which did not have any effects. To confirm these results, we knocked down E2F1 by using a pool of two distinct small interfering RNAs (siRNAs) in the H69 cell line that expresses high levels of E2F1 and is deficient in p53. In these cells, the silencing of E2F1 (Figure 2a, left panel) was accompanied by a significant increase of *VEGF<sub>121</sub>*, *VEGF<sub>165</sub>* and *VEGF<sub>189</sub>* mRNA levels as detected by RT–qPCR (Figure 2a, right panel). These data were confirmed by ELISA assay and western blotting. Indeed, we found that neutralization of E2F1 increased VEGF levels in both culture supernatants (Figure 2b) and cellular extracts (Figure 2c). Overall, these data show that E2F1 negatively controls VEGF<sub>xxx</sub> mRNA and protein levels in tumour cells independently of p53 and under normoxic conditions.

### *E2F1 inhibits VEGF-A promoter activity in a p53-independent manner*

On the basis of our data showing that E2F1 affects the expression of VEGF<sub>xxx</sub> isoforms independently of p53, we next questioned whether E2F1 could act by controlling the activity of the VEGF-A promoter. H1299 cells were transiently co-transfected with a 2.4-kb VEGF promoter-luciferase construct (pVp-ecor; Figure 3a; Zhang *et al.*, 2000) and increasing amounts of plasmid encoding E2F1, and the luciferase activity was measured 48 h later. As shown in Figure 3b (left panel), E2F1 strongly inhibited the activity of the VEGF





**Figure 1** Overexpression of E2F1 downregulates VEGF<sub>xxx</sub> isoforms in p53-deficient cells. (a–d) H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1(E132) cells were incubated for 48 h in the presence (+) or absence (–) of 1 µg/ml doxycycline (Dox). (a) Upper panel: Western blot analysis of E2F1 protein expression. Actin was used as a loading control. Middle panel: RT–PCR analysis of *Vegf*<sub>189</sub>, *Vegf*<sub>165</sub>, *Vegf*<sub>121</sub>, *neuropilin 1* and *neuropilin 2* mRNAs. Amplified *g3pdh* was used as an internal control. Lower panel: RT–PCR analysis of pro-angiogenic VEGF<sub>xxx</sub> isoforms using a forward primer targeting exon 7 and a reverse primer targeting exon 8a that specifically detects VEGF<sub>xxx</sub>, but not VEGF<sub>xxx</sub>b transcripts. Amplified *g3pdh* was used as an internal control. L: ladder. (b) RT–qPCR analysis of *Vegf*<sub>121</sub>, *Vegf*<sub>165</sub>, *Vegf*<sub>189</sub> and *Vegf*<sub>all</sub> mRNA levels. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) was used as a reference. Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of *Vegf*<sub>121</sub>, *Vegf*<sub>165</sub>, *Vegf*<sub>189</sub> or *Vegf*<sub>all</sub> copy number (target gene) to *gapdh* mRNA copy number multiplied by 100; thus, normalizing *Vegf*<sub>xxx</sub> mRNA expression. For each splice variant, the ratio obtained in cells cultured without Dox was arbitrarily assigned a value of 1. (c) Quantification of VEGF protein level in culture supernatants using the ELISA assay. (d) Western blot analysis of E2F1 and pan-VEGF protein expression. Actin was used as a loading control. Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; VEGF, vascular endothelial growth factor; RT–PCR, reverse transcription–polymerase chain reaction; qPCR, quantitative PCR.

promoter in a dose-dependent manner, whereas it did not affect the activity of the control pGL3-luc vector. Similar results were obtained in SAOS2 cells (Figure 3b, right panel). This effect of E2F1 on the *Vegf* promoter was direct. Indeed, by performing chromatin immunoprecipitation experiments in H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence or absence of doxycycline, we further provided evidence that E2F1 binds to the *Vegf* promoter, whereas no binding to the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) promoter was observed (Supplementary Figure S1). To confirm the

effects of E2F1, we analysed the consequences of its knockdown on the activity of the VEGF promoter in cells that were co-transfected with either pVp-ecor or pGL3-luc and siRNAs targeting E2F1. In both cellular models, the neutralization of E2F1 significantly increased the activity of the VEGF promoter, as compared with cells that were transfected with *mismatch* siRNA. E2F1 had no effect on the pGL3-luc promoter activity (Figure 3c). Taken together, these results show that E2F1 can repress VEGF-A promoter activity independently of p53 and under normoxic conditions.

**Table 1** Primers used for the detection of VEGF<sub>xxx</sub> and VEGF<sub>xxx</sub>b splice variants and *neuropilin-1* or *neuropilin-2* mRNA by using RT-PCR or RT-qPCR

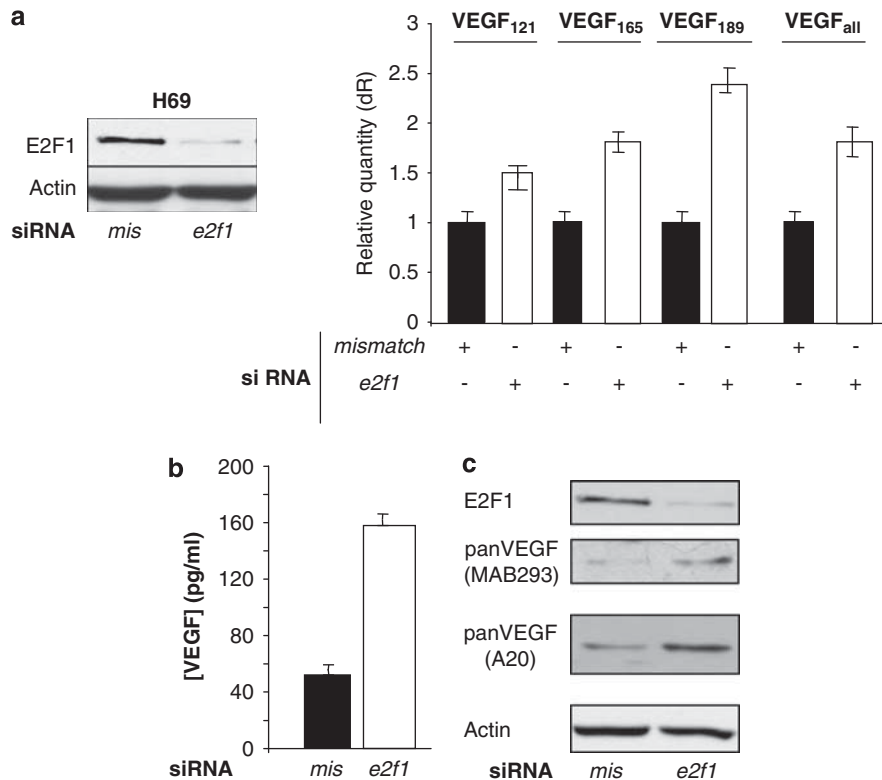
<i>Detection of VEGF<sub>xxx</sub> by RT-PCR</i>	
VEGF forward	5'-AGCTACTGCCATCCAATCGC-3'
VEGF reverse	5'-GGGCGAATCCAATCCAAGAG-3'
VEGF exon 7 forward	5'-GTAAGCTTGTACAAGATCCGCAGACG-3'
VEGF exon 8a reverse	5'-TCACCGCCTCGGCTTGTCACAT-3'
<i>Detection of neuropilins NP1 and NP2 by RT-PCR</i>	
NP1 forward	5'-ATCACGTGCAGCTCAAGTGG-3'
NP1 reverse	5'-TCATGCAGTGGGCAGAGTTC-3'
NP2 forward	5'-GGATGGCATTCCACATGTTG-3'
NP2 reverse	5'-ACCAGGTAGTAACGCGCAGAG-3'
<i>Detection of VEGF<sub>xxx</sub> by RT-qPCR</i>	
VEGF <sub>121</sub> forward	5'-ATAGAGCAAGACAAGAAAAATG-5'
VEGF <sub>121</sub> reverse	5'-ATCGTTCTGTATCAGTCTTTCCT-3'
VEGF <sub>165</sub> forward	5'-AGAGCAAGACAAGAAAAATCC-3'
VEGF <sub>165</sub> reverse	5'-TACAAACAAATGCTTTCTCC-3'
VEGF <sub>189</sub> forward	5'-TATAAGTCCTGGAGCGTTC-3'
VEGF <sub>189</sub> reverse	5'-TACACGTCTGCGGATCTTG-3'
VEGF <sub>all</sub> forward	5'-CTTCTACAGCACAAACAAAT-3'
VEGF <sub>all</sub> reverse	5'-GTCTTGCTCTATCTTCTTTGG-3'
<i>Detection of VEGF<sub>xxx</sub>b by RT-PCR</i>	
VEGF exon 4 forward	5'-GAGATGAGCTTCTACAGCAC-3'
VEGF exon 8b reverse	5'-TCAGTCTTCTGTTGAGAGATCTGCA-3'
VEGF exon 7 forward	5'-GTAAGCTTGTACAAGATCCGCAGACG-3'
VEGF exon 8b reverse	5'-TCAGTCTTCTGTTGAGAGATCTGCA-3'
<i>Detection of VEGF<sub>xxx</sub>b mRNAs by RT-qPCR</i>	
VEGF <sub>121</sub> b forward	5'-AAGGCCAGCACATAGGAGAG-3'
VEGF <sub>121</sub> b reverse	5'-TTCCTGGTGAGAGATTTTCTTG-3'
VEGF <sub>165</sub> b forward	5'-AAGAAAATCCCTGTGGGCCTT-3'
VEGF <sub>165</sub> b reverse	5'-TGGTGAGAGATCTGCAAGTACGTT-3'
VEGF <sub>189</sub> b forward	5'-CTGGAGCGTTCCTGTGG-3'
VEGF <sub>189</sub> b reverse	5'-TGGTGAGAGATCTGCAAGTACGTT-3'

Abbreviations: qPCR, quantitative PCR; RT-PCR, reverse transcription–polymerase chain reaction; VEGF, vascular endothelial growth factor.

### *E2F1 upregulates the expression of antiangiogenic VEGF<sub>xxx</sub>b splice variants*

Having shown that E2F1 downregulates the expression of pro-angiogenic VEGF<sub>xxx</sub> splice isoforms, we next examined whether antiangiogenic VEGF<sub>xxx</sub>b isoforms could also be affected. To achieve this, we performed RT-PCR experiments using intron-spanning primers (Table 1) that detect VEGF<sub>165</sub>b only, even in the presence of VEGF<sub>165</sub> mRNA at a concentration that was 1000 × greater (Bates *et al.*, 2002, 2006; Woolard *et al.*, 2004; Pritchard-Jones *et al.*, 2007; Rennel *et al.*, 2008). Using primers that were complementary to exons 4 and 8b, we were able to amplify a fragment with a size that was consistent with the VEGF<sub>165</sub>b transcript (Figure 4b, right panel). We observed that expression of the VEGF<sub>165</sub>b transcript increased in response to E2F1 induction, a phenomenon that was not observed with the E2F1 mutant (E132). Similar results were obtained using another set of primers that was complementary to exons 7 and 7/8b, and that allowed the detection of VEGF<sub>165</sub>b mRNA only (Figure 4b) (Pritchard-Jones *et al.*, 2007). Therefore, although E2F1 decreases VEGF<sub>xxx</sub> mRNA and protein levels, it seems to affect the expression of VEGF<sub>xxx</sub>b isoforms in an

opposite manner. To confirm these results, we designed primers to perform isoform-specific qPCR of VEGF<sub>121</sub>b, VEGF<sub>165</sub>b and VEGF<sub>189</sub>b splice variants (Table 1 and Figure 4a). Using these specific sets of primers, we showed in our model that E2F1 significantly increased both VEGF<sub>165</sub>b and VEGF<sub>189</sub>b mRNAs, but not VEGF<sub>121</sub>b mRNA (Figure 4c, left panel). Strikingly, under the same conditions, induction of the E2F1 mutant (E132) resulted in a significant decrease in the expression of all three VEGF<sub>121</sub>b, VEGF<sub>165</sub>b and VEGF<sub>189</sub>b variants (Figure 4c, right panel). As a dominant-negative effect of E2F1(E132) has been reported previously (Davis *et al.*, 2006), these results suggest that the binding of E2F1 to DNA is required for the expression of VEGF<sub>xxx</sub>b splice variants. To confirm these results at the protein level, we performed western blot experiments using an anti-VEGF<sub>xxx</sub>b antibody (Woolard *et al.*, 2004). The results showed that in H358 cells, the level of VEGF<sub>165</sub>b protein increased when the expression of E2F1 was induced by doxycycline treatment (Figure 4d, left panel). In these cells, we were not able to detect the VEGF<sub>121</sub>b protein. By contrast, the knockdown of E2F1 in H69 cells correlated with a significant decrease in both VEGF<sub>165</sub>b and



**Figure 2** Silencing of E2F1 upregulates VEGF<sub>xxx</sub> splice variants. H69 cells were transfected for 72 h with either *mismatch* or *e2f1* siRNA. (a) *Left panel*: E2F1 protein level was detected by immunoblotting. Actin was used as a loading control. *Right panel*: RT-qPCR analysis of *Vegf*<sub>121</sub>, *Vegf*<sub>165</sub>, *Vegf*<sub>189</sub> and *Vegf*<sub>all</sub> mRNA levels. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) was used as a reference. Relative gene expression was calculated for each sample as above (Figure 1b). For each splice variant, the ratio obtained in cells transfected with *mismatch* siRNA was arbitrarily assigned a value of 1. (b) VEGF protein level was quantified in the culture supernatants using the ELISA assay. (c) E2F1 and pan-VEGF protein levels were determined in cellular protein extracts by immunoblotting. Actin was used as a loading control. Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; VEGF, vascular endothelial growth factor; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; siRNA, small interfering RNA.

VEGF<sub>121</sub>b proteins as compared with *mismatch*-transfected cells (Figure 4d, right panels). Overall, these results show that E2F1 upregulates the expression of VEGF<sub>xxx</sub>b variants. Therefore, E2F1 controls the switch between VEGF<sub>xxx</sub>/VEGF<sub>xxx</sub>b splice variants and favours the expression of the antiangiogenic VEGF<sub>xxx</sub>b isoforms.

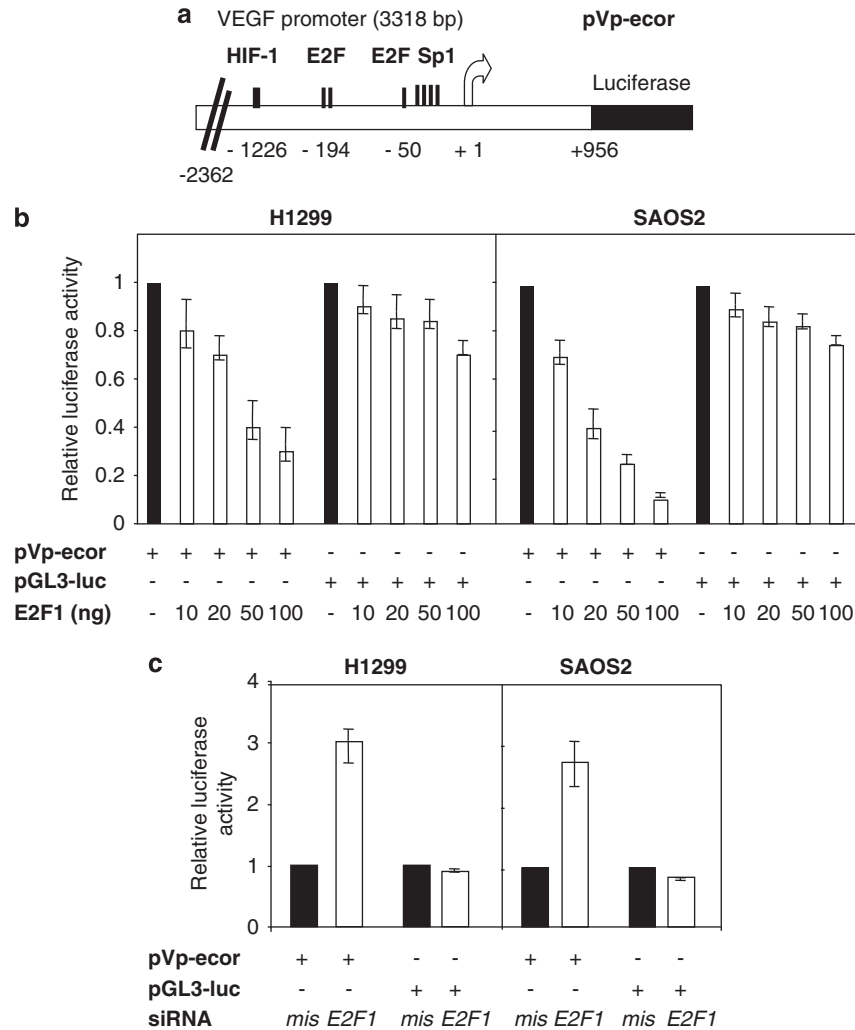
#### The splicing factor SC35 is required for E2F1-induced VEGF<sub>165</sub>b upregulation

We recently identified the splicing factor SC35, a member of the SR family of proteins, as a direct transcriptional target of E2F1 (Merdzhanova *et al.*, 2008). These data led us to postulate that SC35 could be involved in the control of the VEGF<sub>xxx</sub>b/VEGF ratio by E2F1. To test this hypothesis, two distinct siRNAs targeting *sc35* were transfected into H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence or absence of doxycycline, and the expression of VEGF<sub>xxx</sub> and VEGF<sub>165</sub>b splice variants was analysed by RT-PCR (Figure 5a) and western blotting (Figure 5b). In both experiments, the knockdown of SC35 strongly prevented the E2F1-induced increase of VEGF<sub>165</sub>b (Figures 5a and b). Notably, we observed that the neutralization of SC35

*per se* decreased the level of VEGF<sub>xxx</sub> mRNA, whereas it did not significantly affect the levels of VEGF<sub>165</sub>b mRNA. To mimic the induction of SC35 that is detected in E2F1-overexpressing cells, we established inducible SC35 clones derived from H358/Tet-On cells. As shown in Figure 5c, induction of SC35 expression by doxycycline strongly increased the VEGF<sub>165</sub>b/VEGF ratio, indicating that SC35 accumulation recapitulates E2F1 overexpression. Taken together, these results show that SC35 is required for E2F1-mediated VEGF<sub>165</sub>b upregulation in H358 human lung carcinoma cells and suggest that both E2F1 and SC35 proteins cooperate to favour the expression of VEGF<sub>xxx</sub>b isoforms.

#### E2F1 and SC35 inhibit neovascularization in vivo by modulating the VEGF<sub>xxx</sub>b/VEGF ratio

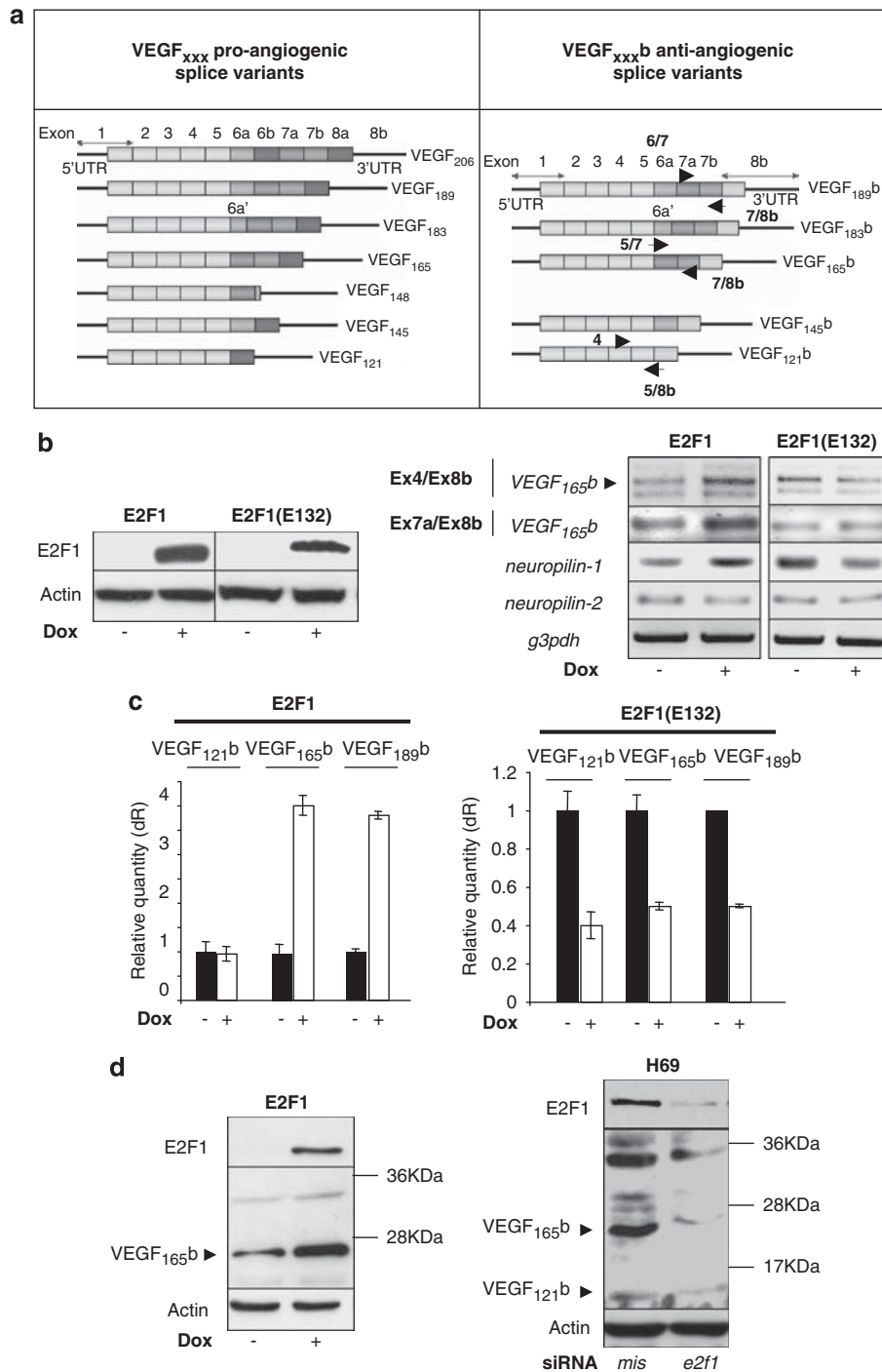
As we showed that E2F1 affects the VEGF<sub>xxx</sub>b/VEGF ratio *in vitro*, we wondered whether this effect could be observed *in vivo*. H358/Tet-On 4 (Tet-On 4; control cells) and H358/Tet-On/E2F1-6 (E2F1-6) cells were subcutaneously injected into immunodeficient nude mice, and the induction of E2F1 expression was achieved by adding doxycycline (Dox +) to the drinking water. To eliminate the potential effects of E2F1



**Figure 3** E2F1 represses VEGF promoter activity independently of p53. **(a)** Schematic representation of VEGF promoter-luciferase reporter pVp-ecor containing the upstream regulatory sequences and promoter region of the human *Vegf* gene (-2362 to +956 relative to the transcriptional start site) fused to the *luciferase* reporter gene in the pGL3-basic vector. The HIF-1-, E2F1- and SP1-*cis*-binding elements are labelled. **(b)** H1299 (left panel) and SAOS2 (right panel) cells were co-transfected for 48 h with 1  $\mu$ g of pVp-ecor or pGL3-luciferase plasmid and increasing amounts of the pCMV-E2F1 vector. The luciferase activity obtained in cells transfected with pVp-ecor or pGL3-luciferase plasmid alone was normalized to 1, and a relative luciferase activity was then calculated for each condition. **(c)** H1299 (left panel) and SAOS2 (right panel) cells were co-transfected for 72 h either with mismatch (*mis*) or with a pool of two distinct *e2f1* (*E2F1*) siRNA and 1  $\mu$ g pVp-ecor or pGL3-luciferase plasmid as indicated. The luciferase activity obtained in cells transfected with pVp-ecor or pGL3-luciferase vector was normalized to 1, and a relative luciferase activity was then calculated for each condition. Abbreviation: VEGF, vascular endothelial growth factor; siRNA, small interfering RNA.

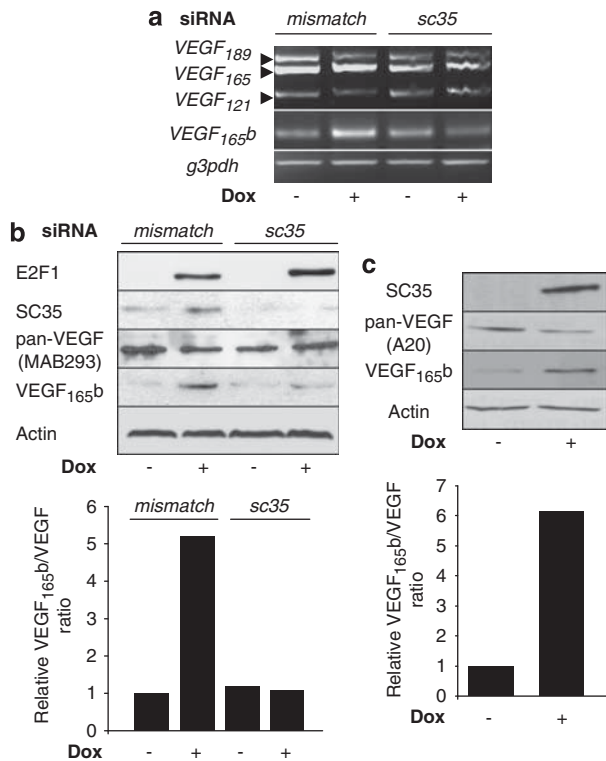
induction on apoptosis and to focus our analysis on early events such as neoangiogenesis, the mice were killed 7 days after drinking doxycycline. Tumours were weighed, and total proteins were extracted from whole tumoural samples. We observed that the induction of E2F1 (E2F1-6, Dox+) significantly diminished the weight of the tumours ( $P=0.0362$ ), a phenomenon that was not observed in the Tet-On 4 control tumours receiving doxycycline (Tet-On 4, Dox+; Figure 6a). We also noted that tumours overexpressing E2F1 (E2F1-6, Dox+) were less haemorrhagic than those derived from control cells (Tet-On 4, Dox+), as well as those from E2F1-6 cells in which the expression of E2F1 was not induced (E2F1-6, Dox-) (Figure 6b, upper panel). Consistent with these findings, the haemoglobin levels were significantly decreased on E2F1 induction (E2F1-6,

Dox+), as compared with uninduced E2F1-6 tumours (E2F1-6, Dox-) (Figure 6b, lower panel;  $P=0.007$ ). This effect was specific as doxycycline did not affect haemoglobin levels in tumours derived from Tet-On 4 control cells. Such an inhibitory effect of E2F1 on tumour neovascularization was further confirmed using CD31 immunostaining of murine endothelial cells. As shown in Figure 6c (upper and lower panels), tumours overexpressing E2F1 displayed significantly less infiltrating murine vessels, as compared with all other conditions ( $P=0.0044$ ). In addition, murine stroma surrounding tumours also appeared less vascularized in E2F1-overexpressing tumours as compared with all other conditions (data not shown). Altogether, these results show that E2F1 prevents neovascularization. To analyse whether this could be linked to modifications of



**Figure 4** E2F1 increases the expression level of VEGF<sub>xxx,b</sub> variants. Exon structure of the VEGF gene. The VEGF gene consists of eight exons. Differential terminal exon 8 splice site selection results in two mRNA isoform families. The pro-angiogenic isoforms (VEGF<sub>xxx</sub>, left) and the antiangiogenic family (VEGF<sub>xxx,b</sub>, right) are generated by the use of the proximal splice site (PSS) and distal splice site (DSS) in exon 8, respectively. The sets of primers used to analyse the expression levels of *Vegf<sub>121b</sub>*, *Vegf<sub>165b</sub>* and *Vegf<sub>189b</sub>* mRNAs by RT-PCR are depicted by arrows. **(b–d)** H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1(E132) cells were incubated for 48 h in the presence (+) or absence (–) of 1 μg/ml doxycycline (Dox). **(b) Left panel:** Western blot analysis of E2F1 or E2F1(E132) protein expression. Actin was used as a loading control. **Right panel:** RT-PCR analysis of *Vegf<sub>xxx,b</sub>*, *neuropilin-1* or *neuropilin-2* mRNAs. Amplified *g3pdh* was used as an internal control. **(c)** RT-qPCR analysis of *Vegf<sub>121b</sub>*, *Vegf<sub>165b</sub>* and *Vegf<sub>189b</sub>* mRNA levels in H358/Tet-On/E2F1 (left panel) or H358/Tet-On/E2F1(E132) (right panel) cells. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) was used as a reference. Relative gene expression was calculated for each sample as described previously (Figure 1b). For each splice variant, the ratio obtained in cells cultured without Dox (black bars) was arbitrarily assigned a value of 1. **(d) Left panel:** Western blot analysis of E2F1 and VEGF<sub>xxx,b</sub> protein expression in H358/Tet-On/E2F1. Actin was used as a loading control. **Right panel:** H69 cells were transfected for 72 h with either *mismatch* or *E2F1* siRNAs, and E2F1 and VEGF<sub>xxx,b</sub> protein levels were studied by immunoblotting. Actin was used as a loading control. Abbreviations: VEGF, vascular endothelial growth factor; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; qPCR, quantitative PCR; siRNA, small interfering RNA.





**Figure 5** SC35 is required for E2F1-mediated VEGF<sub>165b</sub> upregulation. (a, b) H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence (+) or absence (–) of doxycycline were transfected for 72 h with either *mismatch* (*mis*) or *sc35* (*sc35*) siRNA. (a) RT-PCR analysis of *Vegf*<sub>189</sub>, *Vegf*<sub>165</sub>, *Vegf*<sub>121</sub> and *Vegf*<sub>165b</sub> mRNAs. Amplified *g3pdh* was used as an internal control. (b) Upper panel: Western blot analysis of the indicated proteins using specific antibodies. Actin was used as a loading control. Lower panel: The VEGF<sub>165b</sub>/VEGF ratio was calculated after densitometric analysis of specific signals using image J software and normalization to actin signal. A value of 1 was arbitrarily assigned to the ratio obtained in non-induced cells transfected with *mismatch* siRNA. (c) Upper panel: H358/Tet-On/SC35 cells were cultured in the presence (+) or absence (–) of 1 µg/ml doxycycline for 24 h. Western blot analysis of SC35, pan-VEGF and VEGF<sub>165b</sub> protein expression. Actin was used as a loading control. Lower panel: the VEGF<sub>165b</sub>/VEGF ratio was calculated after densitometric analysis of specific signals using image J software and normalization to actin signal. A value of 1 was arbitrarily assigned to the ratio obtained in non-induced cells. Abbreviations: VEGF, vascular endothelial growth factor; RT-PCR, reverse transcription–polymerase chain reaction; siRNA, small interfering RNA.

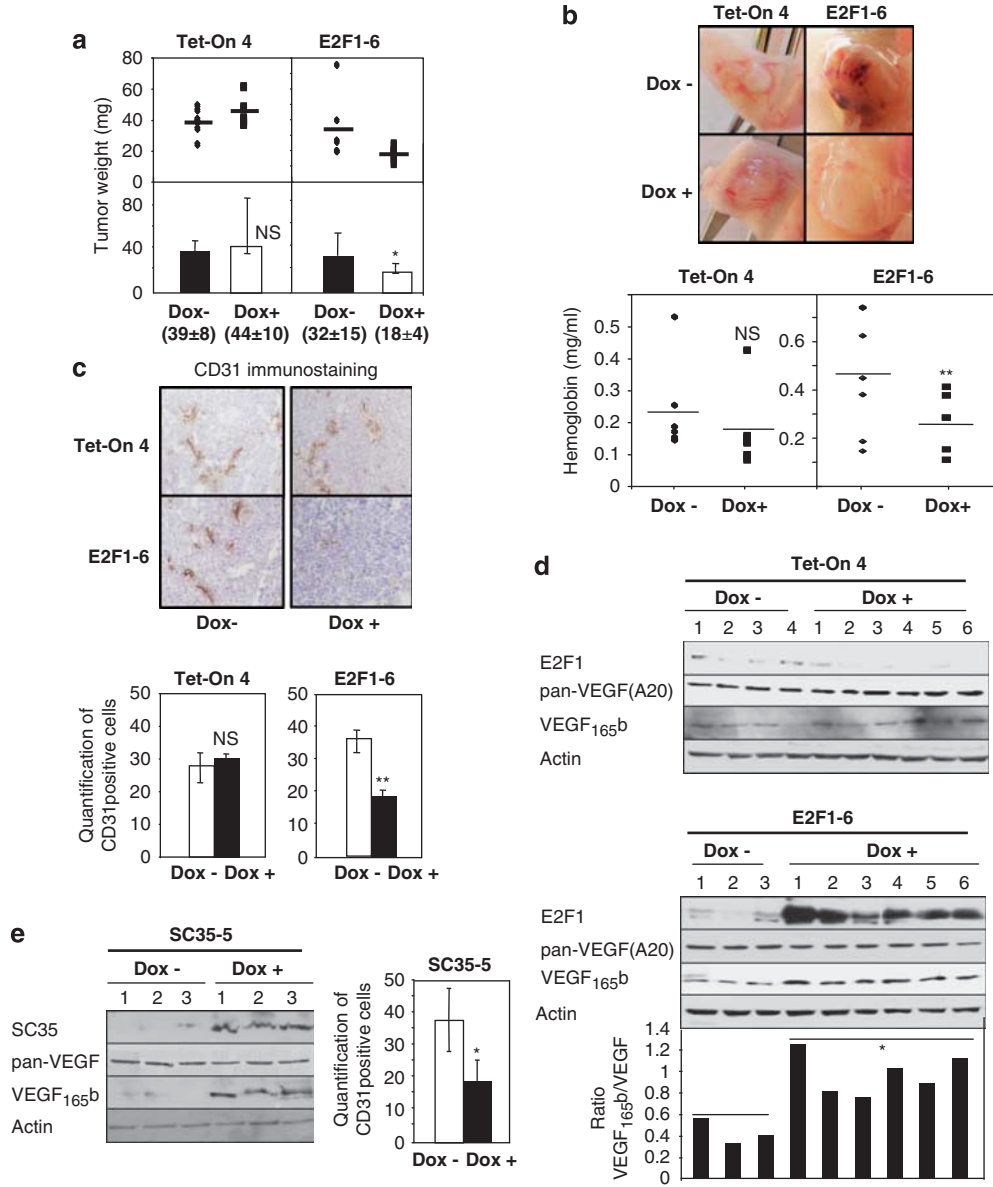
the VEGF<sub>xxx</sub>b/VEGF ratio, we performed western blot analysis on tumour extracts using either anti-pan-VEGF or anti-VEGF<sub>xxx</sub>b antibody. As illustrated, the expression of both VEGF and VEGF<sub>165b</sub> isoforms remained relatively constant in control Tet-On 4 xenografts either in the presence (Dox+) or absence (Dox–) of doxycycline (Figure 6d, upper panel). In contrast, overexpressing E2F1 significantly increased the VEGF<sub>165b</sub>/VEGF ratio (Figure 6d, lower panel). To assess the role of SC35 in this setting, similar experiments were performed using the H358/Tet-On/SC35 cells. As shown in Figure 6e, tumour xenografts overexpressing SC35 (Dox+) displayed a higher amount of VEGF<sub>165b</sub> protein (Figure 6e, left panel)

and a lower amount of CD31-positive infiltrating murine endothelial cells (Figure 6e, right panel and Supplementary Figure S2) as compared with uninduced tumours. Notably, pan-VEGF protein levels were not significantly affected in tumours overexpressing SC35. Taken together, these results show that E2F1 and SC35 proteins can modulate the ratio between the pro- and antiangiogenic isoforms of VEGF in favour of the antiangiogenic entities *in vivo*, leading to the inhibition of tumour neovascularization.

## Discussion

E2F1 was first identified as a crucial regulator of cell cycle progression. However, based on the growing number of studies published in the past decade, it is now clear that E2F1 has numerous other biological roles. Recently, a new function for E2F1 as a negative regulator of angiogenesis has been proposed based on the revelation that mice deficient in E2F1 exhibit enhanced angiogenesis as a result of VEGF overproduction (Qin *et al.*, 2006). In this model, increased angiogenesis occurs during both recovery from ischaemic injury and tumour growth and is dependent on wild-type p53. In this study, we show that E2F1 negatively affects the activity of the VEGF-A promoter in p53-deficient tumour cell lines and under normoxic conditions, indicating that neither hypoxia nor p53 are required for E2F1-mediated VEGF repression in cancer cells. Interestingly, during the writing of this paper, it was also shown that E2F1 cooperates with mutant p53-R175H to promote angiogenesis through the induction of pro-angiogenic soluble mediators (Fontemaggi *et al.*, 2009). Therefore, these data along with our findings suggest that E2F1 could control angiogenesis in an opposite way depending on the status of p53.

An increasing amount of evidence now supports the idea that the balance between VEGF<sub>xxx</sub> (pro-angiogenic) and VEGF<sub>xxx</sub>b (antiangiogenic) splice variants has a crucial role in the control of tumour progression, as well as in the response of tumour cells to anti-VEGF therapies (Bates *et al.*, 2002; Woolard *et al.*, 2004; Rennel *et al.*, 2008; Varey *et al.*, 2008). Recently, it has been shown that VEGF splicing is controlled by the SR proteins ASF/SF2, SRp40 and SRp55 in primary epithelial cells (Nowak *et al.*, 2008, 2010). To date, nothing is known about the factors that control the switch between VEGF<sub>xxx</sub> and VEGF<sub>xxx</sub>b splice variants in cancer cells. In this study, we provide evidence that E2F1 controls the angiogenic switch between pro- and antiangiogenic isoforms of VEGF and favours the expression of the antiangiogenic forms in human lung carcinoma cell lines. What could be the molecular mechanisms involved in this process? We provide evidence that E2F1 decreases the activity of the VEGF-A promoter. Therefore, one possibility is that E2F1 could specifically affect the transcription of pro-angiogenic isoforms, but not that of antiangiogenic isoforms because of the use of a different region of the



**Figure 6** E2F1 and SC35 proteins decrease tumour neovascularization in nude mice. (**a–d**) H358/Tet-On 4 (Tet-On 4) or H358/Tet-On/E2F1 (E2F1-6) cells were subcutaneously injected into nude mice. After 7 days, the animals were treated with (Dox+) or without (Dox–) 2 mg/ml doxycycline for 1 week before they were killed. (**a**) Tet-On 4 and E2F1-6 tumour weights. Bars represent the mean tumour weight in each condition. For each condition, the mean value for tumour weight (mg ± s.d.) is indicated in parentheses. NS: not significant; \**P* < 0.05 using a non-parametric Mann–Whitney statistical test. (**b**) *Upper panel*: Tumours derived from mice injected with either Tet-On 4 or E2F1-6 cells and receiving (Dox+) or not receiving (Dox–) doxycycline in their drinking water. Note that (E2F1-6, Dox+) tumours were less haemorrhagic than (E2F1-6, Dox–) tumours. *Lower panel*: Haemoglobin levels (mg/ml) were quantified in tumours derived from Tet-On 4 or E2F1-6 cells in mice receiving (Dox+) or not receiving (Dox–) doxycycline. Bars represent the mean level in each case. NS: not significant; \*\**P* < 0.01 using a non-parametric Mann–Whitney statistical test. (**c**) *Upper panel*: Murine CD31 immunohistochemical staining in Tet-On 4 or E2F1-6 xenografts. Overexpression of E2F1 (E2F1-6, Dox+) decreases the number of blood vessels per unit area, as compared with uninduced tumours. *Lower panel*: Quantification of microvascular density using CD31 staining. Seven tumours per treatment group were examined. Each point represents the mean of four randomly analysed fields. NS: not significant; \*\**P* < 0.01 using a non-parametric Mann–Whitney statistical test. (**d**) Western blot analysis of E2F1, pan-VEGF and VEGF<sub>165b</sub> protein levels in total protein extracts obtained from tumours derived from Tet-On 4 or E2F1-6 cells treated (Dox+) or not treated (Dox–) with 2 mg/ml doxycycline, as indicated. Actin was used as a loading control. For tumours derived from E2F1-6 cells, histograms represent the VEGF<sub>165b</sub>/VEGF ratio after densitometric analysis of each specific signal that was calculated using image J software normalized to that of actin. \**P* < 0.05 using a non-parametric Mann–Whitney statistical test. (**e**) *Left panel*: Western blot analysis of the indicated proteins in total protein extracts obtained from tumours derived from SC35-5 cells and treated (Dox+) or not treated (Dox–) with 2 mg/ml doxycycline. Actin was used as a loading control. *Right panel*: Quantification of microvascular density using CD31 staining. Six tumours per treatment group were examined. Each point represents the mean of four randomly analysed fields. \**P* < 0.05 using a non-parametric Mann–Whitney statistical test.

promoter. Another possibility is that E2F1 down-regulates the transcription of both pro- and antiangiogenic VEGF isoforms, but favours the use of the distal splice site within exon 8 of the pre-mRNA, thereby generating more antiangiogenic isoforms. In favour of such a hypothesis, we provide evidence that the SR protein SC35 is absolutely required for VEGF<sub>165b</sub> accumulation in response to E2F1, and we show that overexpression of SC35 mimics the positive effects of E2F1 on VEGF<sub>165b</sub> and also decreases the total amount of VEGF. Of note, SC35 did not downregulate the activity of the VEGF-A promoter in our cellular models (data not shown). Therefore, these data strongly suggest that the positive effects of E2F1 on the VEGF<sub>xxx,b</sub>/VEGF balance mainly reflect a splicing event through SC35 upregulation and the preferential choice of the distal splice site inside the *VEGF-A* pre-mRNA. However, the role of SC35 might vary depending on its global amount as its knockdown in H358 cells (Figure 5a), and in other carcinoma cell lines (data not shown), it was found to decrease rather than increase the amount of VEGF. Interestingly, we also observed that E2F1 strongly increases *VEGF<sub>165b</sub>* and *VEGF<sub>189b</sub>* mRNA levels in H358/Tet-On/E2F1 cells, without affecting the levels of VEGF<sub>121b</sub>. Therefore, besides its effects on splicing, we cannot exclude that E2F1 also regulates VEGF<sub>xxx,b</sub> mRNA stability. Of note, this effect could be dependent on the cell type, as the level of VEGF<sub>121b</sub> protein strongly decreased in H69 cells deprived of E2F1 (Figure 4d). Overall, these results suggest another level of complexity in the regulation of VEGF-A splicing by E2F1 and SR proteins in human cancer cells that could be dependent on the cell type, the upstream signals and the total amount of various SR proteins.

Finally, using lung xenografts in nude mice, we show that the inhibition of tumour growth by E2F1 correlates with a decrease in tumour neovascularization, as well as a significant increase of the VEGF<sub>165b</sub>/VEGF balance *in vivo*. Moreover, we provide evidence that tumours overexpressing SC35 also express a greater quantity of VEGF<sub>165b</sub> protein and a lower level of neo-vasculature, as compared with control tumours. Recently, it was shown that overexpressing VEGF<sub>165b</sub> reduces the growth of renal carcinoma cell xenografts, even in the presence of VEGF<sub>165</sub> (Rennel *et al.*, 2008). These data, along with our findings, strongly suggest that the positive effects of E2F1 and SC35 proteins on VEGF<sub>165b</sub> are involved in the reduction of tumour neovascularization. E2F1-deficient mice exhibit impaired apoptotic function, which was previously presumed to explain the increased incidence of cancer in these mice. The results presented herein strongly suggest that this could also result from an increase in the vascular supply of tumours secondary to dysregulated *VEGF* pre-mRNA splicing. Therefore, besides its ability to control the alternative splicing of apoptotic regulators during apoptosis (Merdzhanova *et al.*, 2008), E2F1 also has the capacity to regulate *VEGF-A* pre-mRNA alternative splicing to modulate neo-angiogenesis. These data add further evidence that the regulation of pre-mRNA processing events is a key function of E2F1

that could contribute to its seemingly contradictory roles as both an oncogene and a tumour suppressor.

## Materials and methods

### *Cell lines, plasmids, transfection and luciferase assays*

H358, H1299, H69 and SAOS2 cell lines were cultured as described previously (Salon *et al.*, 2007). All of these cell lines are defective for wild-type p53. The human lung adenocarcinoma H358/Tet-On/E2F1, Tet-On/E2F1(E132) and Tet-On/SC35 inducible clones were obtained as described previously (Salon *et al.*, 2006). E2F1, E2F1(E132) or SC35 expression was induced with 1 µg/ml doxycycline treatment. Transient transfections were carried out using Fugene 6 (Roche Diagnostic, Meylan, France). The plasmids used in transient transfections were pcDNA3, pCMV-E2F1, pGL3-promoter vector and pVp-ecor encoding luciferase under the control of the whole human VEGF promoter (−2362 to +956 relative to the transcriptional start site (Zhang *et al.*, 2000)). Luciferase assays were performed as described previously (Salon *et al.*, 2007).

### *Enzyme-linked immunosorbent assay*

For the quantitative determination of human VEGF concentrations in cell culture supernatants,  $3 \times 10^5$  cells were seeded into six-well plates and incubated for 24 or 48 h before the supernatants were recovered. The determination of VEGF concentrations was performed by ELISA using the Quantikine VEGF immunoassay (DVE00) from R&D Systems (Lille, France). Of note, this assay has been shown to measure all VEGF isoforms, although VEGF<sub>165b</sub> is detected at a lower efficiency according to Varey *et al.* (2008).

### *Antibodies and immunoblotting experiments*

Antibodies used were anti-panVEGF (MAB293) and anti-VEGF<sub>165b</sub> (MAB3045) from R&D Systems; anti-panVEGF (A-20), anti-E2F1 (C-20) and anti-actin from Santa Cruz (TEBU-Bio SA, Le Perray en Yvelines, France); anti-E2F1 (KH95) and anti-mouse CD31 from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France); and anti-SC35 (4F11) from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Immunoblotting experiments were performed as described previously (Salon *et al.*, 2006).

### *Transfection of siRNA oligonucleotides*

The sequences designed to specifically target human *e2f1* RNA were as follows: (1) 5'-GUCACGCUAUGAGACCUCATT-3'; T-3'. The sequences designed to specifically target human *sc35* RNAs were as follows: *sc35* (1) 5'-GCGUCUUCGAGAAGUA CGGT-3'; *sc35* (2) 5'-UCGUUCGCUUUCACGACAATT-3'. The scrambled siRNA oligonucleotides used as a control for all RNA interference experiments were as follows: 5'-UCGG CUCUUACGCAUUAATT-3' and 5'-CAAGAAAGGCCA GUCCAAGTT-3'. Cells were transfected with siRNA oligonucleotide duplexes using Oligofectamine reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Doxycycline (1 µg/ml) was or was not added to the culture medium 4 h after transfection. The cells were analysed 48 or 72 h post-transfection.

### *RT-PCR and RT-qPCR analyses*

All of the primers that were used for the detection of VEGF<sub>xxx</sub>, VEGF<sub>xxx,b</sub>, *neuropilin-1* and *neuropilin-2* mRNAs by RT-PCR (Cheung *et al.*, 1998; Lantuejoul *et al.*, 2003; Bates *et al.*, 2006; Pritchard-Jones *et al.*, 2007) or RT-qPCR (Catena *et al.*, 2007; Elias and Dias, 2008) are detailed in



Table 1. For RT-PCR analysis, total cellular RNAs were isolated using Trizol reagent (Invitrogen). In all conditions, 1 µg of total RNA was reversed transcribed using oligo(dT) primers and Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). For the detection of neuropilin-1, the PCR conditions were 94 °C for 2 min, 34 cycles of 94 °C for 45 s, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and 72 °C for 10 min. For the detection of neuropilin-2, the PCR conditions were 95 °C for 2 min followed by 39 cycles of 94 °C for 15 s, 50 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, and 72 °C for 7 min. For VEGF<sub>xxx</sub> amplification, the PCR conditions (Cheung *et al.*, 1998) were as follows: 94 °C for 2 min, 29 cycles of 94 °C for 45 s, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and 72 °C for 10 min. The detection of VEGF<sub>xxx</sub> transcripts using an exon 7 forward primer and a reverse-specific primer for exon 8a that do not detect VEGF<sub>xxx</sub>b transcripts was performed as described previously (Pritchard-Jones *et al.*, 2007). To detect the antiangiogenic VEGF<sub>xxx</sub>b splice variants, the PCR conditions were 94 °C for 2 min, 35 cycles of 96 °C for 30 s, 65 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and 72 °C for 10 min for the exon 4/exon 8b primer set. For the exon 7a/exon 8b primer set, the PCR conditions were 96 °C for 30 s, 35 cycles of 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and 72 °C for 10 min. Amplification of a GAPDH cDNA (Invitrogen) fragment was performed in the same PCR reaction as an internal control. PCR products were run in a 2–3% agarose gel and were visualized by ethidium bromide staining.

Quantitative real-time RT-PCR was performed on the Stratagene MX3005P apparatus. In total, 1 µg of total RNA was subjected to cDNA synthesis using the Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix for qPCR (Invitrogen) and was subsequently amplified during 40 PCR cycles (10 min at 95 °C and cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). In parallel, RT-PCR detection of the reference gene *GAPDH* was performed for each sample. Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of target gene copy number to *GAPDH* mRNA copy number multiplied by 100; thus, normalizing the expression of VEGF<sub>xxx</sub> and VEGF<sub>xxx</sub>b splice variants. The PCR efficiency was assessed for each set of primers and ranged from 106 to 110%.

#### In vivo studies

All animal experiments were conducted in agreement with the 'Principles of Laboratory Animal Care' (NIH publication no.

86–23, revised 1985) and were approved by a regional ethics committee. Female athymic Swiss nude mice were purchased from Janvier (Le Genest-Isle, France). In all experiments, 20 × 10<sup>6</sup> H358/Tet-On/E2F1, H358/Tet-On/SC35 or H358/Tet-On 4 cells were injected subcutaneously into the nude mice. One week after injection, the mice were randomly separated into two groups (seven mice per group), one receiving doxycycline (2 mg/ml) in their drinking water and the other receiving water only. Seven days later, mice were anaesthetized and killed by cervical dislocation, and the tumours were extracted, weighed and divided before freezing. For western blot analysis, tumours were homogenized in radio immunoprecipitation assay buffer containing protease and phosphatase inhibitors, and immunoblotting was performed on the supernatants as above. The extent of vascularization in tumour samples was assessed in radio immunoprecipitation assay extracts by measuring the amount of haemoglobin using Drabkin's reagent (Sigma, Lyon, France). The results were normalized relative to the amount of protein in each sample. For CD31 immunodetection, frozen sections were fixed in 3.7% paraformaldehyde and immunostained with a rat anti-mouse CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1) antibody using a three-step indirect immunoperoxidase technique.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgements

We thank Patricia Betton, Pascal Perron and Celine Lampreia for technical assistance. This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée Ligue 2007) and by the Conseil Scientifique National d'AGIR *à dom*. Galina Merdzhanova was supported by fellowships from the Research French Ministry and the Fondation pour la Recherche Medicale (FRM). Stephanie Gout was supported by a fellowship from Association pour la Recherche Contre le Cancer (ARC). Valerie Edmond was supported by a grant from the Conseil Scientifique National d'AGIR *à dom*.

#### References

- Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G *et al.* (2001). Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* **61**: 5736–5740.
- Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. (2002). Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* **62**: 7203–7206.
- Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD *et al.* (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* **62**: 4123–4131.
- Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS *et al.* (2006). The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGF<sub>xxx</sub>b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci (London)* **110**: 575–585.
- Carmeliet P, Jain RK. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**: 249–257.
- Catena R, Muniz-Medina V, Moralejo B, Javierre B, Best CJ, Emmert-Buck MR *et al.* (2007). Increased expression of VEGF121/VEGF165-189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis. *Int J Cancer* **120**: 2096–2109.
- Cheung N, Wong MP, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. (1998). Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum Pathol* **29**: 910–914.
- Cohen CD, Doran PP, Blattner SM, Merkle M, Wang GQ, Schmid H *et al.* (2005). Sam68-like mammalian protein 2, identified by digital differential display as expressed by podocytes, is induced in proteinuria and involved in splice site selection of vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol* **16**: 1958–1965.
- Davis JN, Wojno KJ, Daignault S, Hofer MD, Kuefer R, Rubin MA *et al.* (2006). Elevated E2F1 inhibits transcription of the androgen

- receptor in metastatic hormone-resistant prostate cancer. *Cancer Res* **66**: 11897–11906.
- Elias AP, Dias S. (2008). Microenvironment changes (in pH) affect VEGF alternative splicing. *Cancer Microenviron* **1**: 131–139.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**: 669–676.
- Folkman J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* **6**: 273–286.
- Fontemaggi G, Dell’Orso S, Trisciunglio D, Shay T, Melucci E, Fazi F *et al.* (2009). The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 1086–1093.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W *et al.* (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **350**: 2335–2342.
- Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E *et al.* (2005). Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **23**: 3502–3508.
- Jiang SX, Sheldrick M, Desbois A, Slinn J, Hou ST. (2007). Neuropilin-1 is a direct target of the transcription factor E2F1 during cerebral ischemia-induced neuronal death *in vivo*. *Mol Cell Biol* **27**: 1696–1705.
- Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates DO, Claesson-Welsh L. (2008). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak *in vitro* agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res* **68**: 4683–4692.
- Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO. (2007). Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett* **249**: 133–142.
- Lantuejoul S, Constantin B, Drabkin H, Brambilla C, Roche J, Brambilla E. (2003). Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol* **200**: 336–347.
- Merdzhanova G, Edmond V, De Seranno S, Van Den Broeck A, Corcos L, Brambilla C *et al.* (2008). E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ* **15**: 1815–1823.
- Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G *et al.* (2010). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *J Biol Chem* **285**: 5532–5540.
- Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ *et al.* (2008). Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* **121**: 3487–3495.
- Polager S, Ginsberg D. (2008). E2F—at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* **18**: 528–535.
- Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H *et al.* (2007). Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer* **97**: 223–230.
- Qin G, Kishore R, Dolan CM, Silver M, Wecker A, Luedemann CN *et al.* (2006). Cell cycle regulator E2F1 modulates angiogenesis via p53-dependent transcriptional control of VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 11015–11020.
- Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T *et al.* (1995). Mutant *ras* oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* **55**: 4575–4580.
- Rennel E, Waive E, Guan H, Schuler Y, Leenders W, Woolard J *et al.* (2008). The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer* **98**: 1250–1257.
- Robinson CJ, Stringer SE. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* **114**: 853–865.
- Salon C, Eymen B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C *et al.* (2006). E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* **13**: 260–272.
- Salon C, Merdzhanova G, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymen B. (2007). E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors. *Oncogene* **26**: 6927–6936.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**: 843–845.
- Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S *et al.* (2008). VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* **98**: 1366–1379.
- Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO *et al.* (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, *in vivo* effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* **64**: 7822–7835.
- Zhang L, Yu D, Hu M, Xiong S, Lang A, Ellis LM *et al.* (2000). Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* **60**: 3655–3661.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

## CARACTERISATION DE NOUVELLES FONCTIONS BIOLOGIQUES ET MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DU FACTEUR D'ÉPISSAGE SC35 DANS DES MODELES CELLULAIRES DE CARCINOMES PULMONAIRES

La protéine SC35 appartient à la famille des protéines SR (Ser/Arg-rich) connues pour être des régulateurs cruciaux de l'épissage alternatif et constitutif. L'activité de ces protéines est largement régulée par phosphorylation. Alors que plusieurs études ont mis en évidence une dérégulation de l'expression des protéines SR au cours du processus de carcinogenèse, peu de données existent à ce jour concernant les voies de signalisation cellulaire qui contrôlent l'expression et/ou l'activité de ces protéines dans les cellules cancéreuses. Pour la première fois, nous démontrons que SC35 est une protéine acétylée. Cette modification post-traductionnelle met en jeu l'acétyltransférase Tip60 et la déacétylase HDAC6. Nos données mettent aussi en évidence une connexion étroite entre la phosphorylation et l'acétylation de SC35 pour le contrôle de son niveau d'expression et de son activité. Nous démontrons enfin que ces modifications post-traductionnelles de SC35 sont critiques pour l'induction de l'apoptose en réponse aux agents génotoxiques et pour la mise en place d'un phénomène de sénescence en réponse au sodium butyrate, un inhibiteur d'histones déacétylases, dans différentes lignées cellulaires dérivées de carcinomes pulmonaires humains. La protéine E2F1 est un facteur de transcription qui participe au contrôle de la prolifération cellulaire en stimulant le passage des cellules en phase S du cycle cellulaire et est aussi capable d'induire l'apoptose. Au laboratoire, nous avons identifié la protéine SC35 comme une nouvelle cible transcriptionnelle directe de E2F1 et montré que les deux protéines coopèrent pour induire l'apoptose en réponse aux agents génotoxiques. Nous démontrons dans ce travail que SC35 gouverne aussi l'entrée et la progression en phase S en contrôlant certains gènes cibles de E2F1 impliqués dans ce contexte, tels que la cycline E. Nous mettons en évidence que la voie de signalisation cellulaire PI3K/AKT est impliquée dans le contrôle de l'expression de la cycline E médié par les deux protéines E2F1 et SC35, notamment via la phosphorylation de SC35. Finalement, nous décrivons une corrélation directe entre le niveau d'expression protéique de la cycline E et de P-SC35 dans une série de tumeurs pulmonaires neuroendocrines. L'ensemble de ces travaux identifie donc de nouvelles voies de signalisation contrôlant les fonctions cellulaires de SC35 et ouvre des perspectives quant aux conséquences biologiques découlant de la dérégulation de l'expression de SC35 dans les cancers bronchiques.

Mots clés : SC35, acétylation, stress génotoxique, E2F1, cancer du poumon.

## CHARACTERIZATION OF NEW BIOLOGICAL FUNCTIONS AND POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF THE SPLICING FACTOR SC35 IN LUNG CARCINOMA CELL MODELS

The protein SC35 belongs to the SR (Ser/Arg-rich) proteins family known to be key regulators of alternative and constitutive splicing. The activity of these proteins is largely controlled by phosphorylation. While some data have provided evidence that expression of SR proteins is deregulated during the carcinogenesis process, little is known about the cellular signaling networks that control SR proteins expression and/or activity in cancer cells. For the first time, we demonstrate that SC35 is an acetylated protein. This post-translational modification involves the acetyltransferase Tip60 and the deacetylase HDAC6. We also provide evidence that phosphorylation/acetylation signaling networks are closely connected to control SC35 expression level and activity. Finally, we demonstrate that these post-translational modifications of SC35 are critical to induce apoptosis in response to genotoxic stresses as well as to trigger senescence in response to sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, in various human lung carcinoma cell lines. The protein E2F1 is a transcription factor involved in the control of cellular proliferation through its requirement for G1/S phase transition and S phase progression and also for the apoptotic process. In the laboratory, we previously identified the protein SC35 as a new direct transcriptional target of E2F1 and demonstrated that both E2F1 and SC35 proteins cooperate to mediate apoptosis in response to genotoxic stresses. Here, we demonstrate that SC35 also governs the entry and progression into S phase by controlling some E2F1-target genes involved in this setting, such as cyclin E. We provide evidence that the PI3K/AKT signaling pathway is involved in the control of cyclin E expression mediated by both E2F1 and SC35 proteins, notably through the phosphorylation of SC35. We finally describe a direct correlation between cyclin E and P-SC35 protein expression in a series of neuroendocrine lung tumors. Taken together, these results unravel new cellular signaling pathways to control functions of SC35 and open new prospects for the biological consequences of the deregulation of SC35 expression in lung cancer.

Key words : SC35, acetylation, genotoxic stress, E2F1, lung cancer.